CONTRIBUTION A LA PATHOLOGIE DES MELANOMES HUMAINS PAR L'ÉTUDE DE CERTAINES "TUMEURS MELANIQUES" ANIMALES

Travail du Service de Recherches du Centre Régional Anti-Cancéreux
de Marseille et du Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire
de la Faculté de Médecine de Marseille

THÈSE

présentée et publiquement soutenue
devant la Faculté de Médecine de Marseille

le Mardi 9 Novembre 1971

par

Henri-Pierre BONNEAU
Né le 14 Décembre 1941 à Marseille

Externe des Hôpitaux de Marseille
Assistant à la Faculté de Médecine
Maître en Biologie Humaine (Anatomie Pathologique)

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

Examinateurs de la Thèse :

M. le Professeur **X. SERAFINO**, Président

MM. les Professeurs :

P. LAFFARGUE
H. PAYAN
M. TOGA
G. LEBREUIL

Assesseurs

Imprimerie Ecole Technique « Don Bosco »
78, Rue Stanislas-Torrents - Marseille (6e)

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

CONTRIBUTION A LA PATHOLOGIE DES MELANOMES HUMAINS PAR L'ÉTUDE DE CERTAINES "TUMEURS MELANIQUES" ANIMALES

Travail du Service de Recherches du Centre Régional Anti-Cancéreux
de Marseille et du Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire
de la Faculté de Médecine de Marseille

THÈSE

présentée et publiquement soutenue
devant la Faculté de Médecine de Marseille

le Mardi 9 Novembre 1971

par

Henri-Pierre BONNEAU

Né le 14 Décembre 1941 à Marseille

Externe des Hôpitaux de Marseille
Assistant à la Faculté de Médecine
Maître en Biologie Humaine (Anatomie-Pathologie)

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

Examinateurs de la Thèse

M. le Professeur **X. SERAFINO**, Président

MM. les Professeurs :

P. LAFFARGUE
H. PAYAN
M. TOGA
G. LEBREUIL

Assesseurs

Imprimerie Ecole Technique « Don Bosco »
78, Rue Stanislas-Torrents - Marseille (6e)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen : H. ROUX — Doyen Honoraire : G. MORIN

Assesseurs : G. SERRATRICE, H. PAYAN, R. DEPIEDS et R. DEVIN

Attaché Principal, Responsable des Services Administratifs : P. MOUCHET

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs titulaires

Clinique oto-rino-laryngologique	MM. APPAIX
Clinique médicale B et Gérontologie	AUDIER
Clinique médicale infantile	BERNARD R.
Clinique de neurologie	BOUDOURESQUES
Pharmacologie	BOUYARD
Bactériologie et Virologie	BRAHIC
Clinique chirurgicale	CARCASSONNE F.
Clinique pédiatrique	CARCASSONNE M
Clinique pneumo-phtisiologique	CHARPIN
Physiologie	CORRIOL
Immunologie	DEPIEDS
Chimie biologique	DERRIEN
Médecine sociale	DESANTI
Séméiologie chirurgicale	DEVIN
Médecine expérimentale	DONNET
Clinique de chirurgie thoracique	DOR
Physique	DUBOULOZ
Clinique urologique	DUCASSOU
Ophtalmologie	FARNARIER
Anatomie pathologique	GASTAUT
Thérapeutique	GERARD
Pathologie chirurgicale	GRANJON
Anatomie	GRISOLI
Clinique dermatologique	HADIDA
Anatomie appliquée et Chirurgie expérimentale	HENRY
Chirurgie thoracique et Chirurgie du cœur	HOUEL
Chirurgie générale	IMBERT
Clinique ophtalmologique	JAYLE
Clinique cardiologique et Cardiologie expérimentale.	JOUVE
Clinique stomatologique	LACHARD
Anatomie pathologique	LAFFARGUE
Clinique chirurgicale	LAMY
Physiologie des voies respiratoires	LAVAL
Electroradiologie	LEGRE
Clinique chirurgicale C générale et vasculaire	LENA
Biochimie médicale	LISSITZKY

Clinique des maladies des voies respiratoires et de la nutrition	MM. MONGES H.
Séméiologie médicale	MONGIN
Physiologie	MORIN
Médecine légale et Médecine du Travail	MOSINGER
Pathologie interne	MOUREN
Clinique médicale thérapeutique et des maladies du sang	OLMER
Pédiatrie	ORSINI
Clinique neuro-chirurgicale	PAILLAS
Anatomie pathologique	PAYAN
Clinique exotique	PENE
Histologie et Embryologie	PICARD
Parasitologie	RANQUE
Clinique des maladies infectieuses	RAYBAUD
Clinique rhumatologique	RECORDIER
Physique médicale	ROUX
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	SALMON
Gastro-entérologie	SARLES
Hygiène et Médecine Sociale	SAUTET
Clinique et épidémiologie des cancers	SERAFINO
Clinique obstétricale et gynécologique	SERMENT
Clinique médicale	SIMONIN
Histologie et embryologie	STAHL
Clinique psychiatrique	SUTTER
Microbiologie	TAMALET
Dermato-vénéréologie	TEMIME
Oto-rhino-laryngologie	TISSIE
Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice de l'adulte	TRIFAUD
Clinique d'Endocrinologie	VAGUE

Professeurs sans chaire

MM. BERNARD P.-M.	M. GUERINEL	MM. ROLLAND
CHEVROT	M^me^ JOUVE	SALAMON
DALMAS	MM. JULLIEN	TATOSSIAN
DUMON	MURATORE	TOGA
GASCARD	NICOLI	VITRY
GEVAUDAN	PLASSE	ZWIRN

Maîtres de Conférences Agrégés

MM. ACHARD
ARGEME
BAILLE
BARDOT
BATTESTI
BAURAND
BERGOIN
BERNARD P.-J.
BIMAR
BONNEAU
BOUTIN
BOUYALA
BOYER J.-B.
BUISSON
BUREAU
CARTOUZOU
CHARREL
CLAUSTRE
CLEMENT J.-P.
CLEMENT R.
CODACCIONI
COMBALBERT
COTTE
DELBOY
DERLON

MM. DOR
DUFOUR
FARISSE
FIGARELLA J.
FRANÇOIS
FOURNIER
GABRIEL
GALINIER
GARCIN
GAUTHIER
GIRAUD F.
GRIMAUD
HUGUET
IMBERT Paul
JOUGLARD
KAPHAN
KHALIL
LEBREUIL
LOUCHET
MALMEJAC Cl.
MERCIER Cl.
METGE
MICHEL-BECHET
MIRANDA
MONTIES

MM. MURISASCO
OLMER M.
OHRESSER
PADOVANI
PIANA
PICAUD
Mlle PINSARD
MM. POGGI
PRIVAT
QUILICI
RAYBAUD C.
RICHAUD
ROUX
RUF
SARACCO
SARLES J.
SEDAN
SEITE
SERRATRICE
SOULAYROL
SPITALIER
Mlle STRIGLIONI
MM. TARANGER
TORRESANI
VAGUE Ph.

Agrégés en exercice

M. BRICOT

M. MONGES André

Agrégés libres

MM. BERARD
BERTHIER
BREMOND
BOURRET
CARCASSONNE Y.
CASANOVA

MM. CHAUVIN
COIGNET
COMITI
COURBIER
FIGARELLA
GAMBARELLI

MM. GARES
JEAN
MICHOTEY
OLLIVIER
OURGAUD
PAOLI
REBOUD

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545820_0017

A MON GRAND-PERE,

Médecin-Colonel des Troupes Coloniales
Officier de la Légion d'honneur

« *In Memoriam* »

Tu as été le premier de notre famille à suivre la carrière médicale et toute notre jeunesse tu nous a poussé dans cette voie que tu as magnifiquement honorée. Nous aurions aimé que tu fus là pour le jour de notre soutenance.

A MON PERE,

Professeur Agrégé d'Anatomie Pathologique
Biologiste des Hôpitaux. Chef de Service

Tu as guidé nos premiers pas dans la vie et tu nous as dirigé avec constance dans nos études. Ce travail que tu nous as inspiré est le tien et celui de toute l'équipe que tu diriges avec un dynamisme et une vitalité souvent difficiles à suivre. Trouve ici l'expression de mon admiration et de ma profonde affection.

Que ma carrière médicale soit le digne reflet de la tienne.

A MA MERE,

Tu n'es que tendresse et abnégation pour tous les tiens. Tu as toujours été là pour m'aider à franchir les obstacles dans les moments les plus difficiles.

Que ta vie soit un exemple pour moi.

A MA FILLE,

Rayon de joie et d'amour, dans une période difficile de ma vie. Que dans l'avenir tu trouves auprès de moi tout ce que m'ont donné mes parents.

A MA GRAND-MERE,

A MA SŒUR,

Inséparables dans notre enfance, nous le resterons dans la vie, qui nous trouvera toujours unis quelles que soient les circonstances. Trouve ici l'expression de mon immense amour fraternel.

A MON BEAU-FRERE,

A MES NEVEUX

A TOUS LES MIENS.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur Xavier SERAFINO

Directeur du Centre Régional Anti-Cancéreux de Marseille
Professeur de Clinique et d'Epidémiologie du Cancer
Chirurgien des Hôpitaux, Chef de Service
Officier de la Légion d'honneur

Très vieil ami de mon père, vous nous avez fait l'honneur de bien vouloir présider notre Jury de Thèse.

Appartenant comme Externe au C.R.A.C.M. et comme Attaché à son Service de Recherches, nous avons tout de suite apprécié votre très haute érudition, vos connaissances carcinologiques et votre humanisme. Mais pour le biologiste que je souhaite devenir, ce qui nous a surtout frappé, c'est votre penchant pour la Recherche. Dès votre arrivée à la Direction du Centre, vous avez participé à toutes les réunions scientifiques qui s'y sont tenues.

Nous ne pouvions avoir meilleur juge que vous et nous vous dédions ce travail d'oncologie expérimentale en témoignage respectueux de notre reconnaissance.

A NOTRE JURY DE THÈSE

A NOTRE MAITRE,

Monsieur le Professeur Pierre LAFFARGUE

Professeur d'Anatomie Pathologique
Biologiste des Hôpitaux, Chef de Service

Depuis votre arrivée à Marseille vous vous êtes toujours penché avec sollicitude sur nos études à la Faculté de Médecine. Vous nous avez toujours conseillé avec la plus grande justesse.

Dans le cadre du C.E.S. d'Anatomie Pathologique et de la Maîtrise en Biologie Humaine, nous avons apprécié l'étendue de vos connaissances et l'originalité de vos conceptions dans la pathologie génitale endocrinienne et tumorale.

Nous sommes, par ailleurs, en contact constant avec vous pour les problèmes quotidiens de notre spécialité.

Enfin, vous êtes un adepte et un exemple pour nous de l'adage « mens sana in corpore sano ».

En vous remerciant d'avoir bien voulu faire partie de notre Jury de Thèse, recevez, ici, l'expression de notre très profonde admiration.

A NOTRE MAITRE,

Monsieur le Professeur Henri PAYAN

Assesseur du Doyen
Professeur d'Anatomie Pathologique
Biologiste des Hôpitaux, Chef de Service

La luminosité de votre enseignement, l'enthousiasme que vous y mettez sont pour beaucoup dans mon orientation anatomo-pathologique.

Grâce à vous, nos connaissances dans le cadre du C.E.S. et de la Maîtrise d'Anatomie Pathologique s'accroîssent sans cesse.

Vous nous avez fait l'insigne honneur de nous appeler dans votre équipe et de bien vouloir nous considérer comme l'un de vos élèves. Nous espérons ne pas vous décevoir et nous vous exprimons, ici, toute l'ampleur de notre gratitude.

A NOTRE MAITRE,

Monsieur le Professeur Maurice TOGA
Professeur d'Anatomie Pathologique

Au cours de nos études, nous avons toujours admiré la logique et la simplicité de votre enseignement. C'est là le fruit d'un grand Art.

Votre esprit éclectique et sportif m'a toujours séduit.

L'an dernier, vous m'avez fait l'honneur de participer à votre enseignement à la Faculté Nord. Le travail que vous m'avez demandé a été bénéfique et m'a mis en présence des réalités et des difficultés de l'enseignement. Je ne saurait jamais trop vous en remercier.

Votre présence dans mon Jury de Thèse n'est qu'un bien faible témoignage de ma reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET AMI,

Monsieur le Professeur Georges LEBREUIL
Maître de Conférences Agrégé d'Anatomie Pathologique
Biologiste des Hôpitaux

Depuis que nous avons abordé nos études du troisième cycle : C.E.S. d'Anatomie Pathologique et Maîtrise en Biologie Humaine, nous avons été journellement en contact avec vous.

C'est au tout jeune Maître que vous êtes que nous confions nos préoccupations théoriques et diagnostiques. Vous êtes très près de nous et nous apprécions toute l'étendue de vos connaissances.

Je vais avoir le plaisir de travailler constamment avec vous et je devrais en tirer le plus grand profit.

D'avance, je tiens à vous en remercier en espérant être digne de votre enseignement.

A NOS MAITRES DE CANCEROLOGIE EXPERIMENTALE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

A Monsieur le Professeur Raymond LATARJET

Professeur de Radio-Biologie à la Faculté des Sciences de Paris
Directeur du Laboratoire Pasteur de l'Institut Curie
Commandeur de la Légion d'honneur

Nous avions le plaisir et l'honneur d'avoir fait votre connaissance sur les « links ». Nous ne pensions pas alors que vos éminents travaux seraient à l'origine de ce travail d'oncologie expérimentale.

Nous avons toujours admiré la clarté et la précision de vos raisonnements scientifiques et surtout vous nous avez appris la probité scientifique.

Nous garderons toujours présent à l'esprit votre exemple.

A Monsieur le Professeur Georges MATHE

Professeur de Cancérologie Expérimentale
Chevalier de la Légion d'honneur

Nous n'oublierons jamais l'année pendant laquelle nous avons suivi votre enseignement du C.E.S. de Cancérologie Expérimentale. Elle aura été pour nous l'une des plus fructueuses.

La très haute qualité et la diversité de l'enseignement sous l'autorité de votre si éblouissante personnalité sont à l'origine de mon orientation vers la recherche cancérologique.

Ce modeste travail en est un témoignage que nous vous adressons comme remerciements.

A Monsieur le Professeur Agrégé J.-L. AMIEL

Professeur de Cancérologie Expérimentale

Votre très vaste culture, votre équilibre, votre sens critique, ont été pour nous un exemple.

Nous avons appris à raisonner et à établir dans l'expérimentation ce qui doit en rester de valable ; nous vous en sommes hautement reconnaissant.

A NOS MAITRES DANS LES HOPITAUX
ET AU CENTRE REGIONAL ANTI-CANCEREUX DE MARSEILLE

Monsieur le Professeur J. PAOLI

Directeur Honoraire du C.R.A.C.M.
Chevalier de la Légion d'honneur

Avec vous nous avons abordé la carcinologie clinique. Vos vastes connaissances bibliographiques ont été pour moi un étonnement constant.

Mais ce que nous avons surtout retenu de vos enseignements c'est le « NON NOCERE » et le côté « humain » de notre art.

Monsieur le Professeur P. LAVAL

Professeur de Physio-Pathologie Respiratoire

Vous nous avez dispensé vos soins depuis notre enfance, avant de nous initier à la pneumologie. Vous nous avez donné l'exemple de l'amour du travail constant, consciencieux et bien fait.

Vous êtes l'un de nos Maîtres qui reporte sur nous l'amitié indéfectible que vous portez à notre père.

Monsieur le Docteur Roger LIEUTAUD

Biologiste Anatomo-Pathologiste du C.R.A.C.M.

Pendant les deux années que nous avons passées dans le laboratoire d'Anatomie Pathologique du C.R.A.C.M., vous avez dirigé nos premiers pas dans cette discipline et vous nous avez appris à faire selon les règles, les nécropsies.

A la Faculté de Médecine, nous avons apprécié la luminosité et la précision de votre enseignement pratique que vous avez toujours prodigué avec une extrême gentillesse.

Nous conserverons toujours présent à notre esprit vos conseils.

Nous avons eu l'honneur d'être externe dans leur service.

A NOS MAITRES ET A NOS CAMARADES DU SERVICE DE RECHERCHE DU CENTRE REGIONAL ANTI-CANCEREUX DE MARSEILLE

A Monsieur le Docteur G. MEYER
Biologiste du C.R.A.C.M.

Aussi bien dans le domaine de la Biologie Clinique que dans celui de l'Oncologie Expérimentale, nous avons bénéficié de vos enseignements et de vos conseils. Votre esprit critique, caustique souvent, nous a appris à exposer avec clarté et prudence le résultat de nos recherches.

Nous vous demandons de bien vouloir continuer à nous faire bénéficier de votre très grande culture scientifique oncologique.

A Monsieur le Docteur J.-P. CESARINI
Chargé de Recherches du C.R.A.C.M.

Ami de toujours, tu nous as appris avec fougue et passion la technique de la Microscopie électronique. Ton acharnement au travail et ton enthousiasme nous ont souvent dépassé ! Tes « colères », le plus souvent calculées, n'avaient pour but que ta hâte d'obtenir des résultats valables. La plus grande partie de l'électronique de cette thèse a été tirée des documents que tu as accumulés.

Pour toi et ta femme, amie de mon enfance, reçois, pour tout, un très grand merci.

A Monsieur le Docteur J.-P. KLEISBAUER
Assistant de Biologie du C.R.A.C.M.

Mon cher Ami, tu nous as beaucoup aidé avec les "écuries" que tu nous as faites pour passer le cap de certains écueils universitaires. Par la suite, tu nous as entraîné, par ton dynamisme et par ton allant, dans ton sillage. Une grande partie de ce travail sur les tumeurs « noires » équines te revient.

Merci de ton aide si efficace.

Françoise BIRG,

Catherine et Philippe DE MICCO,

Marie-Anne NOSNY,

Marie-Rose MARTIN,

Roland POIRIER.

A TOUS CEUX QUI NOUS ONT APPORTE LEUR CONCOURS POUR CE TRAVAIL D'EQUIPE :

M^me^ le Docteur ROBERT-VAGUE et le Docteur G. INGENITO
Assistants d'Anatomie Pathologique

avec lesquels nous travaillons depuis deux ans dans le Service d'Anatomie Pathologique. Ils nous ont enseigné les arcanes des autopsies et nous ont apporté leur aide pour l'étude anatomo-pathologique et cytologique de ce mémoire.

Roger FAVRE et Monique BEREBBI

Vous avez toute ma reconnaissance pour votre aide en génétique et surtout pour votre très grande amitié.

M^me^ VERRIER

Vous m'avez apporté votre aide dans la recollation de toutes les expérimentations animales et vos lumières sur les techniques histo-enzymologiques des mélanomes.

Docteur G. DURAND,
Vétérinaire Inspecteur des Abattoirs

Nous vous devons tous les documents sur les tumeurs du cheval et d'avoir bien voulu nous admettre aux Abattoirs de Marseille.

M^lle^ L. PONS

Nous a initié, comme tous les chercheurs du Service, aux techniques utiles à la réalisation de ce travail. C'est elle qui permet, par son travail constant, de retrouver entièrement classés tous les documents. Sans elle, rien n'est réalisable de valable dans le Service de Recherches.

J. INGRAND avec ses Collaborateurs

a contribué à la réalisation de l'iconographie. Sa haute technique, associée à sa très grande expérience, nous ont été des plus utiles. Nous lui dédions, en hommage et en remerciements, toute l'illustration de cette thèse.

A J. BIREAUD, Gabrielle GARGUILO, Michèle TORRENTE, Danièle LOBEZ

Nos remerciements pour leur aide technique.

A Madame Denise BALAGUE

Merci d'avoir bien voulu vous charger de la mise au propre de nos documents manuscrits.

AU LABORATOIRE D'ANATOMIE ET DE CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE.

Docteur Ivan VARETTE

Chargé de cours à la Faculté de Chirurgie Dentaire

Nous vous avons suivi ces dernières années dans votre activité journalière auprès des malades. Vous êtes un maître du diagnostic extemporané et nous avons bénéficié de votre très grande expérience.

Votre rigueur dans la lecture des examens histologiques est pour moi un exemple.

Trouvez ici un témoignage de ma très grande reconnaissance et de ma profonde amitié.

Docteur Michèle MESNY-MOUTAFFIAN

Le diagnostic cytologique est devenu une activité importante du pathologiste et c'est un de vos domaines favoris. Vous nous avez fait profiter de vos connaissances et de vos conseils. Vous trouverez ici un des côtés fondamentaux de la cytologie que nous vous dédions.

A TOUT LE PERSONNEL DU SECRETARIAT ET DE LA TECHNIQUE

qui nous apporte son aide constante.

A NOS FIDELES COMPAGNONS D'ETUDES :

Docteur A. ANTOLINI

Ami des mauvais jours comme des meilleurs, nous avons gravi ensemble les échelons de la Faculté. Ce sont des liens qui restent toujours gravés.

Docteur J.-C. MUSELLI

Ami de toujours, nous avons été élevés ensemble et nous avons poursuivi ensemble la conquête de nos diplômes.

Reçois, ici, ainsi que ta mère, l'assurance d'une indéfectible et très fidèle amitié.

A TOUS MES AMIS...

LE GROUPEMENT DES ENTREPRISES FRANÇAISES CONTRE LE CANCER (G.E.F.L.U.C.),

en assurant l'entier fonctionnement du département de Microscopie électronique du Service de Recherche, nous a apporté dans ce travail une très large contribution.

Monsieur le Professeur Robert De VERNEJOUL
Président d'Honneur du G.E.F.L.U.C.
Membre de l'Institut
Commandeur de la Légion d'honneur

Monsieur Alexandre OLIVA
Président du G.E.F.L.U.C.
Officier de la Légion d'honneur,

trouvez dans cette thèse un témoignage de notre reconnaissance.

LA LIGUE NATIONALE DE LUTTE CONTRE LE CANCER,

dans le cadre de l'opération Espoir, a attribué des contrats sur l'étude des mélanomes expérimentaux, au Service de Recherche du C.R.A.C.M., dont nous avons largement bénéficié, ainsi que de l'aide que nous avons reçue de ses boursiers.

A M. le Professeur LACASSAGNE,
Membre de l'Institut
Commandeur de la Légion d'honneur

son Président,

nous présentons nos déférents remerciements.

LA FONDATION DE LA RECHERCHE MEDICALE FRANÇAISE,

par les subventions qu'elle attribue au Service de Recherche du Centre Régional Anti-Cancéreux de Marseille, a largement contribué au programme de recherche sur les mélanomes.

A tout son Conseil d'Administration et à son Conseil Scientifique, nous adressons l'expression de notre très grande reconnaissance.

Introduction

La biologie moléculaire, comme l'ont montré, par le biais des gènes, A. LWOFF, S. MONOD et F. JACOB, nos derniers Prix Nobel de Médecine, s'applique à tout ce qui vit.

La synthèse des protéines se fait par le même processus que ce soit au niveau de l'être unicellulaire ou au niveau des différentes cellules constituant par leur assemblage l'homme que l'on considère comme l'être vivant le plus hautement différencié.

Il doit en être de même de l'étude des tumeurs dont les synthèses au niveau des cellules transformées sont perturbées. L'étude de modèles expérimentaux chez l'animal, quoiqu'on en pense beaucoup, doit apporter des éclaircissements sur la biologie du même type de tumeur chez l'homme.

C'est en fin de compte l'objet des travaux d'oncologie expérimentale que de nous donner les moyens de prévenir et de combattre au mieux, dans l'état de nos connaissances, le cancer. C'est le but qui nous a toujours dirigé dans l'élaboration de cette thèse.

Nous avons eu la possibilité et la chance, pendant trois ans, de participer, dans les Services de Biologie du Centre Régional Anti-Cancéreux de Marseille, dirigé par le Professeur J. PAOLI, puis par le Professeur X. SERAFINO, aux travaux qui s'y poursuivent tant du côté clinique que biologique.

L'un des pôles d'attraction du Service de Recherches depuis huit ans, sous l'impulsion de H. BONNEAU, son Directeur, est le « mélanome » aussi bien dans ses aspects morphologiques que biologiques.

Les thérapeutiques, à visée immunologique, traitement « auxiliaire » ou complémentaire, bien entendu, devenant de plus en plus nécessaires, de nombreux travaux ont été effectués ou sont en cours.

Le procédé de R. LATARJET (1) par les extraits autologues irradiés aux rayons ultra-violets avait été mis au point dans les leucémies murines, souris Akr, dues au virus de Charlotte FRIEND.

Sur les conseils de cet auteur, toute une série de travaux ont été entrepris par H. BONNEAU, G. MEYER (2) et leurs collaborateurs (3 - 4 - 5) dans un système différent sur les tumeurs solides dues au virus Polyome, tant chez le Hamster que chez la souris.

Dans le même temps, de timides essais thérapeutiques faits chez l'homme par H. BONNEAU et ses collaborateurs (6 - 7) donnèrent des résultats discor-

dants de ceux obtenus par M. DARGENT à Lyon dans les tumeurs mélaniques. La possibilité d'un effet facilitant a pu même être mise en cause par cet auteur.

Aussi était-il nécessaire de revenir à l'expérimentation animale avant de poursuivre les essais chez l'homme qui paraissaient assez favorables à H. BONNEAU.

Les tumeurs mélaniques spontanées du Hamster semblèrent valables pour de tels essais et, pour les compléter, il est apparu également utile d'avoir un système chimio-induit. Le dimethyl-benzanthracène provoquant chez ce même animal des tumeurs mélaniques, on pourrait faire une étude comparative.

Enfin, J.-P. KLEISBAUER, qui s'occupe du département de biochimie, s'étant attaqué à la structure moléculaire du support protéique du mélanosome, se trouva bloqué par le manque de matériel nécessaire aux biochimistes. Les tumeurs du Hamster sont minuscules et celles de l'homme aussi peu importantes, tout au moins celles sujettes à l'exérèse. Il eut alors l'idée de s'adresser à M. G. DURAND, Vétérinaire Inspecteur des Abattoirs de Marseille, qui s'intéresse aux tumeurs animales, pour obtenir des « tumeurs noires » du cheval. Ainsi eut-il à sa disposition des kilogrammes de tumeurs, sur lesquels il pouvait enfin travailler valablement.

Mais le mélanome spontané du Hamster, le mélanome chimio-induit par le diméthyl-benzanthracène et les tumeurs « noires » du cheval ont rapidement posé des problèmes morphologiques et biologiques.

Tout ce matériel expérimental devait être contrôlé au point de vue anatomo-pathologique qu'ultrastructural. Il s'est avéré peu à peu que certaines données devaient être précisées et pouvaient compléter la magnifique thèse inaugurale de J.-P. CESARINI (8) faite dans ce même service de recherches, sur les tumeurs « noires » de la peau chez l'homme.

Une étude de pathologie comparée pourrait, en particulier, apporter des notions complémentaires sur le potentiel évolutif des mélanomes souvent si déroutant en clinique humaine. Tel malade paraissait irrémédiablement voué à une généralisation rapide, est encore en vie plusieurs années après, alors qu'un autre après une exérèse, parfois un peu hâtive et trop limitée, d'une tumeur d'apparence anodine, est emporté en quelques mois et même quelques semaines dans une explosion métastatique.

Chez le cheval en particulier, les points de vue sont très divergents : « mélanose » ou « mélanome ». Ce point est essentiel à déterminer car les travaux de biochimie entrepris par J.-P. KLEISBAUER risquent de ne plus être applicables à la pathologie humaine des mélanomes malins. C'est un des éléments que nous tenterons de résoudre.

L'histoire et les données actuelles sur la biologie du mélanome constitueront la première partie de notre mémoire (9).

Dans la deuxième partie, nous exposerons le matériel animal qui a été mis à notre disposition, ainsi que les techniques utilisées dans notre travail.

Dans la troisième partie, nous analyserons les données morphologiques et biologiques qui les accompagnent.

La quatrième partie tentera de faire une synthèse pour aboutir aux conclusions que l'on pourra envisager.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I

Historique

Au cours de ces vingt dernières années, les recherches sur la structure des mélanomes ont été particulièrement fructueuses.

Depuis MASSON qui en 1947 (10 à 13) a pensé que le mélanoblaste était une cellule glandulaire capable d'injecter son produit de sécrétion dans d'autres cellules, un long chemin a été parcouru.

Sa théorie a trouvé confirmation non seulement dans sa nature même, mais également dans son embrycgénèse et dans son histogénèse.

En 1956, BIERBECK, MERCER et BARNICOT (18) donnent les premiers clichés de Microscopie électronique.

En 1963, SEIJI, FITZPATRICK, BIERBECK et collaborateurs montrent que le mélanosome et la tyrosinase sont à la base de la mélanogénèse (19 à 25).

MISCHIMA, de 1960 à 1967, dans toute une série de travaux en Microscopie électronique, envisage une conception nouvelle de l'histogénèse du mélanome malin et des proliférations du système pigmentaire (25 à 39).

De 1966 à 1971, J.-P. CESARINI apporte la contribution de l'Ecole Marseillaise à l'ultrastructure des tumeurs noires de la peau (8 - 40 à 44).

Avec H. BONNEAU, dans une série de travaux (45-46), il donne des descriptions en ultrastructure de la mélanose de DUBREUIL et la notion de mélanome malin « in situ », venant à l'appui des travaux de CLARK (47) et de sa conception actuelle de la classification des mélanomes de la peau chez l'homme.

Mais la recherche fondamentale sur les tumeurs noires qui ne peut s'effectuer chez l'homme, avait besoin de modèles expérimentaux à condition que ceux-ci soient valables et suffisamment semblables aux tumeurs humaines.

Les animaux auxquels on s'adresse sont la souris, le rat, le hamster. Le cheval se prête peu à l'expérimentation à proprement parler, mais le matériel qu'il peut donner est si important qu'il est actuellement très étudié. Ces animaux font spontanément des tumeurs mélaniques et, par surcroît, on peut induire chez eux des mélanomes.

La souris : Les premières tumeurs animales ont été décrites chez la souris en 1930 par HARDING et PASSEY. Tumeur qui depuis cette époque est régulièrement transplantée et est devenue une souche de laboratoire (48-49-50).

En 1937, CLOUDMAN observe un mélanome spontané chez une souris femelle DBA. Cette tumeur est transplantable et en 1954 il avait passé sur 178 générations. On donne le nom à cette tumeur de mélanome S 91 CLOUDMAN.

Partant de cette tumeur, ALGIRE, en 1944, décrit le mélanome S 91 A de la souris et sa forme achromique, obtenue par passage sur les souris Albinos BALB/C (51 à 54).

Le rat est également capable de donner des tumeurs mélaniques spontanées comme le montre IGLESIAS en 1960 et il induit également chez cet animal, par le D.M.B.A., des mélanomes transplantables (55-56).

C'est en 1956 que *le hamster* devient un animal de choix pour l'expérimentation des tumeurs mélaniques. DELLA-PORTA, RAPPOPORT, SAFFIOTTI et SHUBIK obtiennent des lésions mélaniques de la peau du hamster en utilisant un carcinogène chimique : 9-10 dimethyl 1-2 benzanthracène (D.M.B.A.) (57 à 61).

A la même époque, KIRKMAN et son équipe décrivent des tumeurs mélaniques induites par l'association oestrogène-androgène (62).

En 1957, FORTNER décrit le premier mélanome spontané chez le hamster syrien et c'est une souche dérivant de cette tumeur que nous avons utilisée (65-66).

GREEN, en 1958, montre la transformation achromique et sarcomateuse au cours des transplantations du mélanome spontané du hamster (67 à 70).

En 1960, un autre procédé d'induction chimique par l'urethane est obtenu par PIETRA et SHUBIK (63-64).

En ce qui concerne *le cheval,* il y a plus de 150 ans que l'on connaît les tumeurs noires qui atteignent les chevaux gris et blanc.

Les premiers écrits sur ce sujet sont ceux de GOLDBERG en 1919 et FELDMAN en 1932, dans un ouvrage sur les tumeurs des animaux domestiques qui rapporte des cas typiques de tumeurs mélaniques équines (71-72).

HADWEN (73), en 1931, et Mc FEDYEAN (74), en 1933, en font une étude clinique et histologique, et parlent de sarcome ou de mélanose, alors que RUNNELS et BENBROOK, en 1941, décrivent le mélanome malin des chevaux et des mules à propos de quelques observations (75).

Mais le travail clinique, histologique et pathogénique revient à LEVENE qui, en 1965, y consacre une thèse qui fait autorité en la matière. Pour lui, il s'agit d'une perturbation dans la mélanogénèse du cheval (76-77).

En 1971, H. BONNEAU présente la première étude en Microscopie électronique des tumeurs mélaniques du cheval (78).

En 1965, à la 6e Conférence internationale sur les cellules pigmentées (79), l'ensemble des travaux expérimentaux ont été rapportés et ont fait l'objet d'une monographie sur la structure du mélanocyte et sur les différents aspects biochimiques et la biologie du mélanome.

Les travaux immunologiques sur les tumeurs mélaniques humaines et expérimentales sont des notions récentes.

Un groupe de recherches de l'Europeen Organization of Research of Treatment of Cancer (E.O.R.T.C.), dont la section Mélanome a été créée en 1969, a pour but de coordonner les travaux de recherches sur la biologie des mélanomes et leur traitement.

Un premier symposium sur la biologie du mélanome a eu lieu à Lyon, le 12 juin 1970, où fut exposée, par LEWIS, NAGEL et G. MEYER (80), l'immunologie actuelle des mélanomes humains et expérimentaux.

En 1971, au mois de juin, se sont réunis à Lyon, en même temps, le Groupe Mélanome de l'Office Mondial de la Santé (O.M.S.) et le Groupe Mélanome de l'E.O.R.T.C. A cette occasion a eu lieu le deuxième symposium sur la biologie du mélanome (81).

Enfin, en septembre 1971, se sont réunis, à Marseille, les immunologistes du Groupe E.O.R.T.C. pour l'unification des techniques à utiliser dans la recherche des antigènes de membrane des cellules de mélanome malin.

CHAPITRE II

Les données actuelles sur la pathologie et la biologie des tumeurs du système mélanogène

Au cours de ces dernières années, les recherches sur les mélanomes malins, tant en histologie conventionnelle qu'en ultrastructure, ont fait l'objet de nombreux travaux. A ceux-ci sont venues s'ajouter les données récentes en biochimie et en immunologie. Nous devons donc avoir une vue précise de ces éléments nouveaux pour discuter valablement nos résultats expérimentaux.

On sait quelle redoutable tumeur représente le mélanome malin. Elle peut apparaître à tous les âges et atteindre aussi bien l'homme que la femme et un assez grand nombre d'animaux. Il y a cependant, dans son évolution, des caractères très variables que les études récentes permettent de prévoir. L'anatomie pathologique, l'ultrastructure et son lieu d'origine sont des éléments à considérer.

Nous rappelons donc :

I. — Les données histologiques eu ultrastructurales normales
II. — Les conceptions actuelles de la classification des mélanomes
III. — Les données du cyto-diagnostic
IV. — Les données ultrastructurales des tumeurs « noires »
V. — Les données immunologiques actuelles.

I. — LES DONNEES HISTOLOGIQUES ET ULTRASTRUCTURALES NORMALES DU TISSU MELANOGENE

A) HISTOLOGIE : Le mélanocyte normal et les cellules claires de l'épiderme ou des muqueuses épidermoïdes (82-8-83).

L'examen histologique d'une coupe incluse en paraffine ne donne qu'une idée asesz relative de l'importance quantitative des mélanocytes présents dans la couche basale de l'épiderme.

Les coupes semi-fines, après fixation pour la microscopie électronique et inclusion dans les matières plastiques, permettent d'identifier de manière plus complète le groupe des cellules claires de l'épiderme. Ces cellules claires en position immédiatement supra-basale peuvent être démantelées sur des critères ultrastructuraux. Il s'agit :

— des mélanocytes,

— des cellules de Langerhans,

— de la cellule de Merckel au niveau des muqueuses.

Le mélanocyte est une cellule qui synthétise du pigment mélanique. Il est constitué d'un corps cellulaire adjacent à la membrane basale. Il envoie des prolongements dendritiques entre les kératinocytes adjacents et plus superficiels. Aucun desmosome ne relie cette cellule aux cellules voisines. (Pl. I.)

Le mélanocyte est parfois en contact avec une autre cellule claire, *la cellule de Langerhans,* et nous verrons en physiopathologie les inter-relations entre ces deux cellules (84-85-86).

On peut, en histologie photonique, distinguer les trois types de cellules claires par des critères histochimiques. Les mélanocytes ont une activité dopa-oxydase et présentent, par conséquent, une dopa-réaction positive. Les cellules de Langerhans ont une activité or colloïdal positive et se rattachent, par ce caractère, au groupe des cellules du système réticulo-endothélial.

Les cellules de Merckel contiennent des grains argentaffines s'apparentant par ces caractères aux cellules de Kultchitsky-Masson et au grand groupe du système des cellules claires de Feyrter.

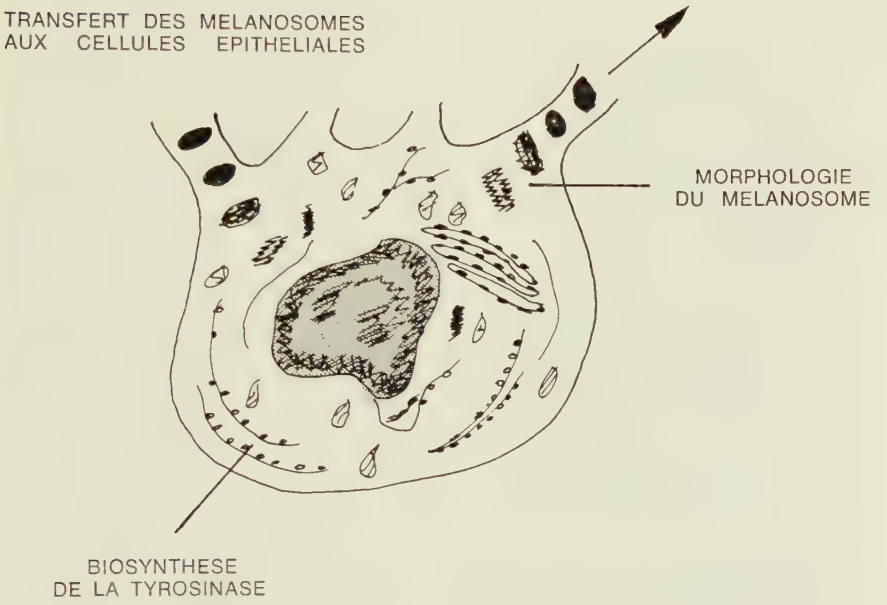
B) ULTRASTRUCTURE :

1. Le mélanocyte (8) :

L'étude ultrastructurale du mélanocyte a permis de mettre en évidence toutes les étapes de synthèse de la mélanine depuis l'appareil de Golgi aux granules mélaniques matures, présents essentiellement dans les prolongements dendritiques (Pl. II).

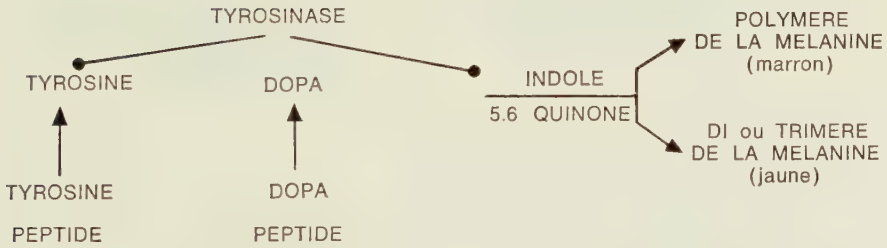
La constitution de la protéïne est le premier événement de la synthèse. La forme, la taille et la structure du mélanosome sont génétiquement déterminées. Les mélanocytes déversent dans les kératinocytes voisins leurs

PLANCHE I



BIOSYNTHESE

DE LA TYROSINE - MELANINE



(Schéma d'après Fitzpatrick)

Schéma de la synthèse intra-cellulaire du mélanosome et son expulsion au niveau des prolongements cytoplasmiques, dans un mélanocyte normal (d'après FITZPATRICK).

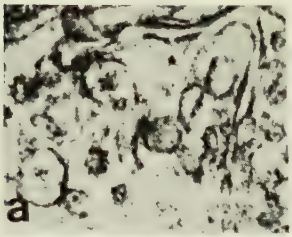
PLANCHE II

Les étapes de la synthèse du mélanosome : du côté gauche, le schéma, à droite en regard de chaque étape, la correspondance en ultrastructure (d'après J.-P. CESARINI).

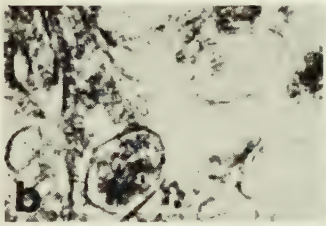
Dans une vésicule située près de l'appareil de Golgi, apparaissent des fibrilles (a). Cette vésicule augmente de taille et les fibrilles s'enroulent (b). L'enroulement de la protéine entraîne l'apparition d'une striation périodique de 100 A° qui caractérise le pré-mélanosome strié (c). L'opacification de cette structure conduit au stade du mélanosome (d). Les mélanosomes quittent le mélanocyte pour d'autres cellules où ils forment des phagosomes (e).

RIBOSOME

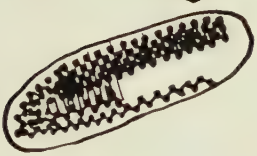
VESICULE GOLGIENNE

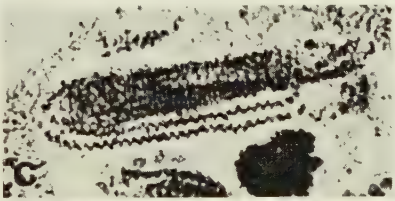


PREMELANOSOME FIBRILLAIRE

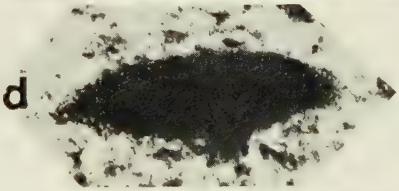


PREMELANOSOME STRIE





MELANOSOME



PHAGOSOME

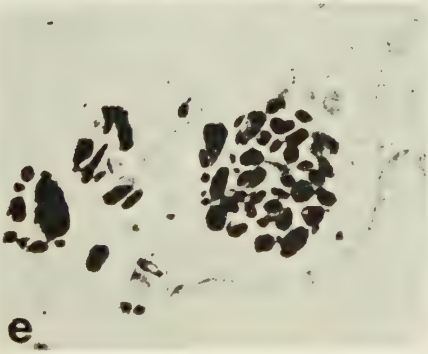


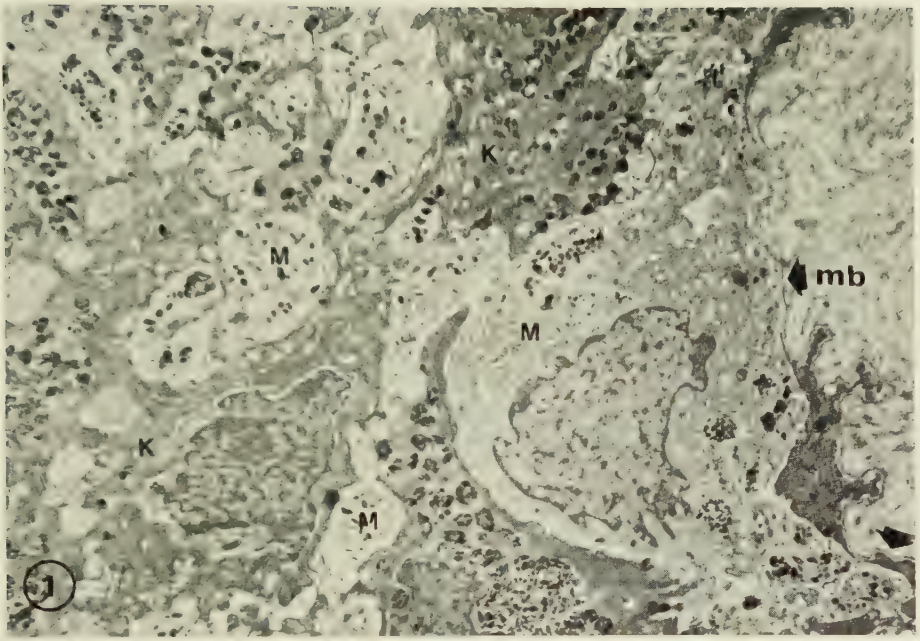
PLANCHE III

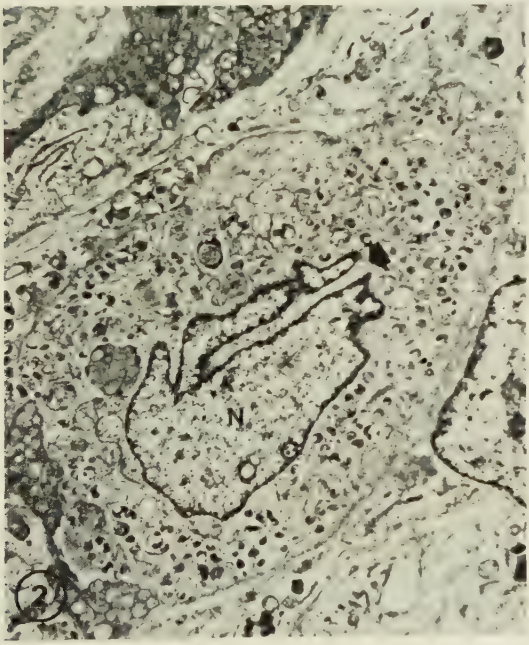
Mélanocytes et mélanophages

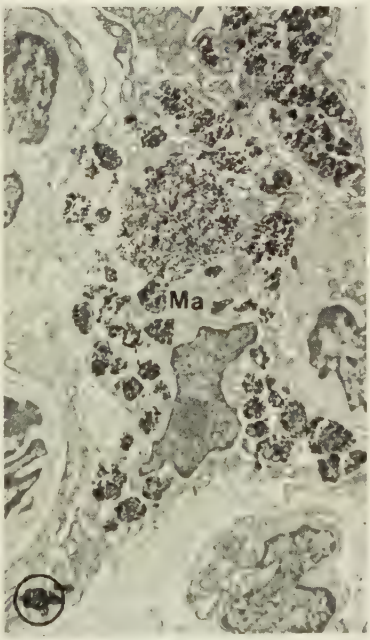
Figure 1 : Aspect général en ultrastructure d'une plage de mélanocytes contenant très peu de mélanosomes (M). Par contre, accumulation de ces organites dans les espaces interstitiels (g X 5000).

Figure 2 : Aspect général d'un mélanocyte malin avec des anomalies, déjà visibles à ce grossissement, des mélanosomes (g X 5.000).

Figure 3 : Aspect général d'un mélanophage qui contient de nombreux mélanosomes atypiques dans des phagosomes. Cette cellule histiocytaire correspond aux cellules à « gros grains » que l'on voit en cytologie optique (Pl. VI, fig 7 (g X 5.000).


K
M
mb
M
K
M
1


N
2


Ma

granules de mélanine par un processus encore imparfaitement connu. La détoxication du produit de sécrétion des mélanocytes est un élément vital pour leur bonne préservation (Pl. III).

2. **La cellule de Langerhans :**

Elle contient un organelle caractéristique formé par une vésicule à laquelle est appendue une structure tubulaire. Cette structure apparaît ainsi sur les clichés en deux dimensions, mais on sait qu'il s'agit en fait d'une vésicule aplatie. Quoi qu'il en soit, la structure en raquette authentifie la nature langerhansienne de la cellule. Cette cellule serait d'origine histiocytaire et conserverait des propriétés macrophagiques participant aux défenses et au processus général de détoxication des mélanocytes.

3. **La cellule de Merckel,** à la différence des précédentes, est liée aux kératinocytes par des desmosomes et à la membrane basale par des hémidesmosomes. Elle contient, à côté d'un noyau extrêmement tourmenté, des granules de sécrétion de petite tàille, à contenu dense et limités par une membrane plus claire, assimilable morphologiquement aux granules de neurosécrétion (83).

Ces trois types de cellules claires, que l'histologie conventionnelle confond, sont donc, sur un plan ultrastructural, bien définis, mais il est évident, et nous le rappellerons ici, que les cellules claires de la peau ne sont pas accessibles à la cytologie. L'élaboration du pigment s'avère donc être l'une des activités essentielles du mélanocyte. Synthétisé dans le mélanocyte, et par conséquent présent à l'état normal dans cette cellule sous forme de granules isolés, il va être retrouvé dans les kératinocytes sous forme d'amas de petits granules dans les mélanophages du derme superficiel, sous forme d'inclusions comprenant plusieurs centaines de mélanosomes dans les cellules de Langerhans où ils subissent une destruction enzymatique.

Ce sont ces différents typtes de cellules entrant dans le cadre des cellules « tatouées » qui accompagneront les proliférations tumorales.

Certaines altérations pathologiques du mélanocyte vont faire apparaître des mélanosomes composés de plusieurs sub-unités lorsque le processus de détoxication du mélanocyte est altéré. Ces processus peuvent être prévus : perte des rapports normaux des mélanocytes et des kératinocytes, destruction massive du mélanocyte, altération de la membrane du mélanocyte.

II. — LES CONCEPTIONS ANATOMO-PATHOLOGIQUES DES TUMEURS DU SYSTEME MELANOGENE

A) Les conceptions classiques des tumeurs du système mélanogène :

Schématiquement, nous distinguerons :

1. **Les hyperplasies bénignes** dont les localisations peuvent être supra-basales, infra-basales, composées ou mixtes. Ceci correspond au schéma ci-joint. Dans ces ca s,il n'y a pas d'anomalie cytologique. Un état d'hyperplasie du système mélanocytaire peut exister, mais nous ne retrouvons aucun des caractères de malignité.

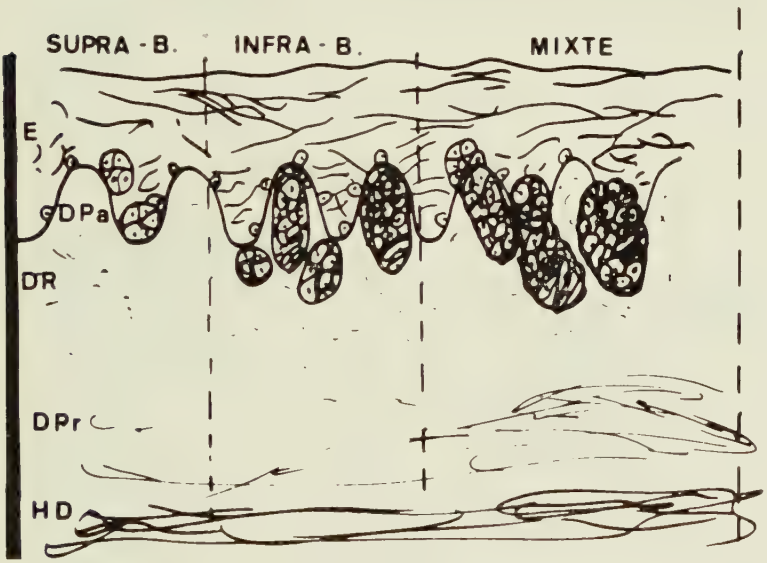
2. **« Les états frontières » :** Il s'agit de la prolifération du système mélanocytaire dont le pourcentage de transformation maligne est élevé (20 à 50 %). Cette forme est appelée mélanose circonscrite pré-cancéreuse.

3. **Les mélanomes malins :** Il s'agit de la prolifération atypique des mélanocytes envahissant le derme et l'épiderme. Les critères de malignité se retrouvent à tous les niveaux, ainsi que les anomalies lcytologiques malignes. Cette conception classique amène quelques critiques :

— Les aspects de transition entre tumeur bénigne et maligne manquent et l'expression « activité jonctionnelle », employée par de nombreux auteurs, ne permet pas de distinguer les proliférations mélanocytaires épidermiques des proliférations mélanocytaires intra-dermiques (d'origine naevique) (Pl. IV). Il n'y a pas de critère absolu de transformation d'un mélanome bénin en mélanome malin et l'importance des critères cytologiques de malignité, selon les auteurs, est fort variable.

PLANCHE IV

ACTIVITES JONCTIONNELLES



L'activité « jonctionnelle » dans les « états frontières » des mélanomes, selon les conceptions classiques
E = épiderme - D Pa = derme papillaire - D R = derme réticulé
D Pr = derme profond - H D = hypoderme

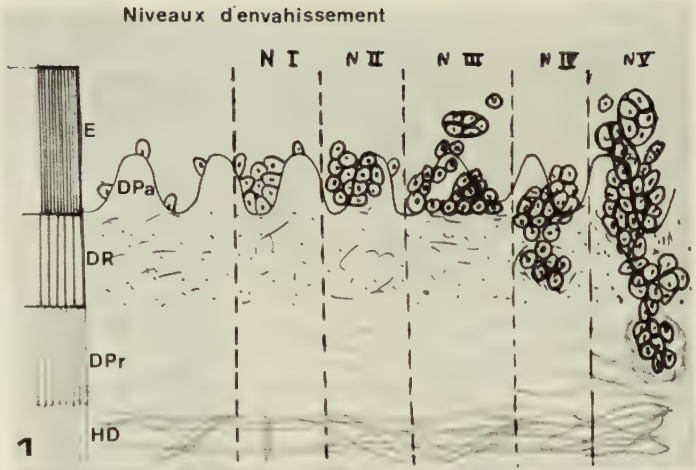
B) Les conceptions actuelles :

Les écoles de CLARK (47), LEVER (82), LUND (87), de Mac GOVERN (88) et enfin du Japonais MISHIMA (37) ont remanié les conceptions que nous venons d'exposer en donnant des grades très précis aux différentes évolutions de la tumeur mélanique maligne. Nous verrons ensuite à quoi correspond cette classification par rapport aux formes histologiques conventionnelles.

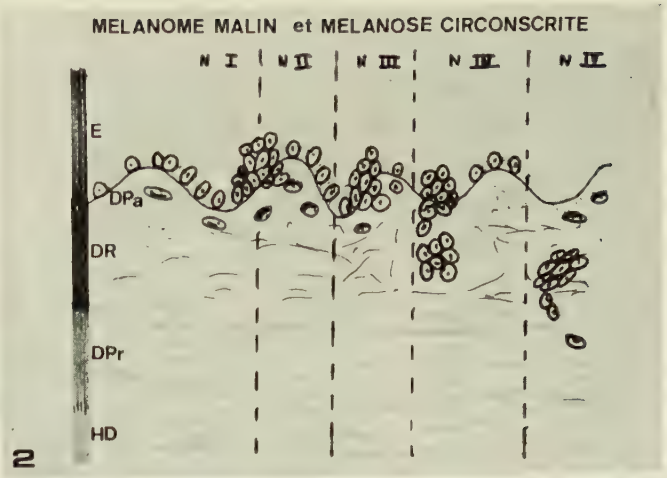
PLANCHE V

D'après la classification de CLARK : les degrés d'envahissement des mélanomes malins cutanés ; 100 mélanomes ainsi classés ont montré des différences pronostiques significatives.

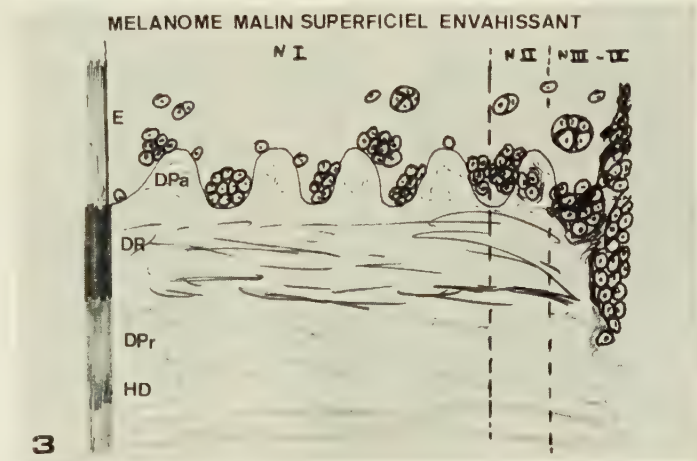
E = épiderme — D P = derme papillaire — D R = derme réticulé — D pr = derme profond — H D = hypoderme.


Niveaux d'envahissement
N I
N II
N III
N IV
N V
E
DPa
DR
DPr
HD

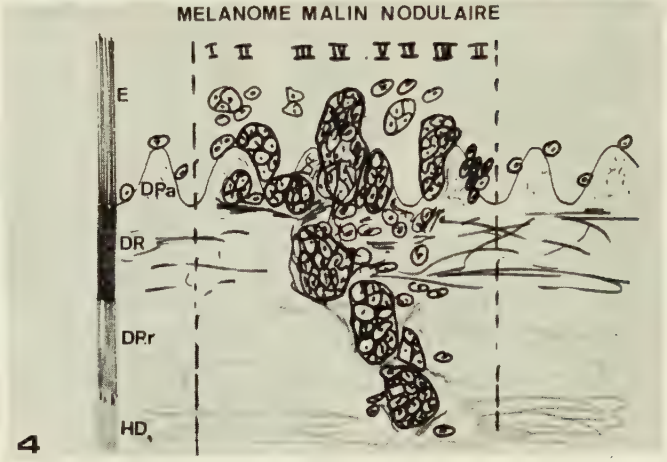
1


MELANOME MALIN et MELANOSE CIRCONSCRITE
N I
N II
N III
N IV
N V
E
DPa
DR
DPr
HD

2


MELANOME MALIN SUPERFICIEL ENVAHISSANT
N I
N II
N III - IV
E
DPa
DR
DPr
HD

3


MELANOME MALIN NODULAIRE
E
DPa
DR
DPr
HD

4

a) **Hyperplasie bénigne :** Ces auteurs ont des conceptions identiques à la conception classique, mais ils font jouer un rôle important à l'absence ou à la présence de caractères cytologiques de malignité et exigent, pour parler d'hyperplasie bénigne, une quiescence parfaite de tous les éléments cellulaires.

b) **Les états frontières :** Leur conception est très élargie. Les auteurs précités considèrent qu'il y a cancer « in situ » dès qu'il y a apparition d'anomalies nucléaires importantes dans les thèques intra-épidermiques. C'est ainsi qu'ils font entrer dans ce cadre la mélanose de DUBREUIL, la mélanose d'HUTCHINSON, le lentigo malin et, d'autre part, le mélanome envahissant superficiel.

c) **Les mélanomes malins :** Leur niveau d'envahissement est classé selon la conception de CLARK en 5 niveaux (Pl. V - Fig. 1 à 4) :

— *niveau 1 :* prolifération strictement intra-épidermique de mélanocytes avec des anomalies nucléaires et cytoplasmiques, c'est le carcinome « in situ ».

— *niveau 2 :* effondrement par cette prolifération de la membrane basale avec envahissement du derme inter-papillaire sans atteinte du derme réticulaire. Une réaction lymphocytaire intense accompagne cette forme et exige la défense immunitaire.

— *niveau 3 :* atteinte du derme papillaire sans envaissement du collagène sous-jacent.

— *niveau 4 :* envahissement du collagène du derme réticulaire.

— *niveau 5 :* envahissement de l'hypoderme.

L'étude statistique de l'évolution de plusieurs centaines de mélanomes classés selon ces niveaux a montré des différences significatives quant au pronostic. Ceci semble donc justifier la distinction de ces niveaux d'envahissement. Il est évident qu'aux stades 4 et 5 tous les mélanomes se ressemblent quels que soient leur origine, mais au niveau inférieur (1, 2, 3) on peut distinguer les trois aspects suivants :

1. **Mélanome malin et mélanose circonscrite** (Pl. V, fig. 2)

Il s'agit au niveau 1 d'une hyperplasie linéaire juxta-basale des mélanocytes au sein de laquelle apparaissent des thèques intra-épithéliales, formées de cellules anormales, au polymorphisme important. L'extension sur les crêtes se fait latéralement et il n'y a pas d'ascension de cellules isolées dans les couches épithétiales supérieures.

Au niveau 2, le derme papillaire est atteint après effondrement de la membrane basale.

La figure n° 1 de la Pl. V montre les différents niveaux d'envahissement.

2. **Mélanome malin superficiel envahissant** (Pl. V, fig. 3)

Le niveau 1 est constitué par la formation de thèques intra-épidermiques couvrant plus de 3 crêtes papillaires de part et d'autre de la zone d'envahissement. Ces thèques sont formées par des cellules claires présentant un monomorphisme relatif et des anomalies cytologiques de caractère malin, des cellules isolées ou des groupes de cellules qui ascensionnent dans l'épiderme. Il n'y a pas d'hyperplasie mélanocytaire accompagnatrice.

Au niveau 2, un envahissement de la papille efface la membrane basale.

Au niveau 3, le processus correspond à l'évolution générale. Pour CLARK, de très nombreux naevi de jonction dits bénins réaliseraient l'aspect correspondant au niveau 1 ou 2. Ce mélanome malin superficiel pourrait rester au niveau 1 pendant de nombreuses années.

3. **Le mélanome malin nodulaire** (Pl. V, fig. 4)

Il se présente d'emblée comme un envahissement de niveau 2 ou 3 du derme inter-papillaire par des thèques malignes avec ascension de thèques dans l'épiderme et absence d'envahissement latéral.

III. — LES DONNEES DU CYTO-DIAGNOSTIC (Pl. VI)

Le cyto-diagnostic des mélanomes doit être réservé à certains cas bien particuliers : tumeurs ulcérées (apposition), adénopathies d'apparence primitive, liquides pleuraux ou ascitiques.

Quelles que soient les circonstances dans lesquelles le cytologiste est amené à examiner des frottis, il se trouvera en présence des mêmes éléments cellulaires.

1. **Les mélanocytes malins** apparaissent la plupart du temps comme étant des éléments cellulaires d'allure épithéliale avec, à la coloration de Papanicolaou ou de Harris-Schorr, un cytoplasme abondant, basophile, un noyau souvent encoché ou avec binucléation et un nucléole extrêmement volumineux. Cette cellule est assez rarement pigmentée.

Nous pensons qu'il est utile, chaque fois que cela est possible, de faire deux colorations différentes : l'une selon les procédés habituels de fixation à l'alcool-éther et l'autre pour coloration de type hématologique au Giemsa. En effet, avec cette coloration on retrouve avec plus de facilité le pigment mélanique.

2. **Les macrophages contenant le pigment mélanique.** — Comme nous le verrons par l'étude en microscopie électronique, les cellules macrophagiques contiennent le pigment mélanique en gros amas dans des cavités revêtues d'une membrane. Dans les frottis, à côté souvent des mélanocytes de type achromique, on distingue très nettement les macrophages avec leurs pigments ocres tout à fait caractéristiques en gros grains.

Il est certain que, dans les cas de doute, une coloration de Perls permettra d'éliminer la possibilité d'une macrophagie des pigments hémosidériniques.

IV. — LES DONNEES RECENTES D'ULTRASTRUCTURE DES TUMEURS DU SYSTEME MELANOGENE (8-42-43-44-45-46)

L'étude ultrastructurale a confirmé, point par point, la notion de niveau d'envahissement définie par CLARK et a apporté d'utiles précisions sur les perturbations de la synthèse de la mélanine au cours des différents types de mélanomes.

PLANCHE VI

Cytologie d'apposition de ponction (coloration de HARRIS-SCHORR).

Figure 1 : Ponction ganglionnaire : mélanocytes peu différenciés.

Figure 2 : Ponction ganglionnaire : cellules très différenciées, peu pigmentées : mélanocytes ou histiocytes ?

Figure 3 : Mélanocytes monstrueux peu pigmentés dans une métastase ganglionnaire.

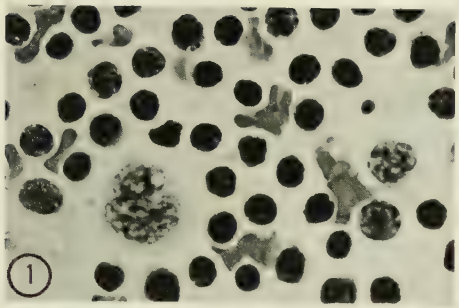
Figure 4 : Autres aspects dans un ganglion, de mélanocytes achromiques.

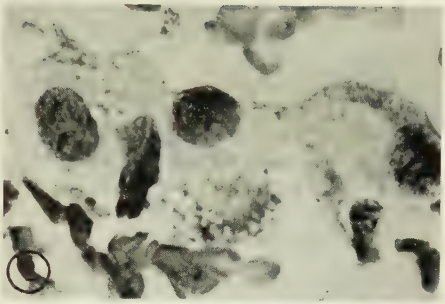
Figure 5 : Mélanocytes à noyaux monstrueux vacuolisés. Dans le cytoplasme, on discerne du pigment mélanique en « poussière ».

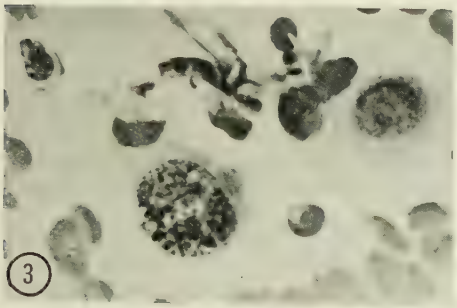
Figure 6 : Métastase ganglionnaire intra-parotidienne d'un mélanome malin : mélanocytes atypiques peu pigmentés.

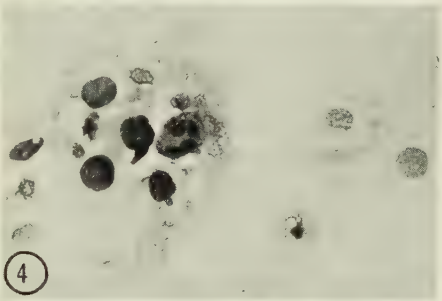
Figure 7 : Dans une métastase ganglionnaire, différents types d'histiocytes bourrés de « gros grains » de mélanine.

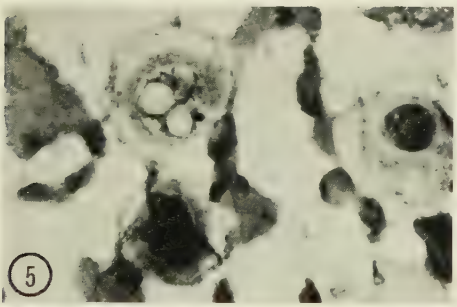
Figure 8 : Mélanocytes malins peu pigmentés dans un liquide pleural métastatique.

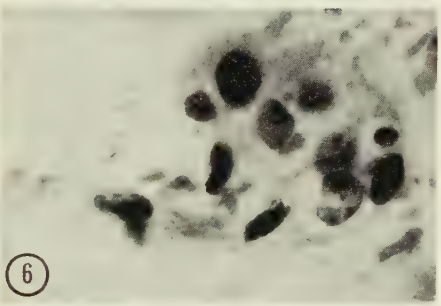

1

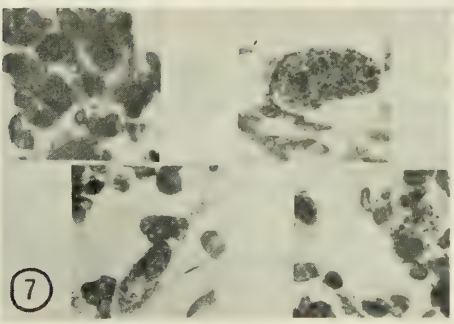

2


3


4


5


6


7

8

J.-P. CESARINI, H. BONNEAU et nous-mêmes avons apporté récemment des données nouvelles sur l'ultrastructure de la mélanose de DUBREUIL. DESTAVILLE (83) y a ajouté ses constatations dans les localisations buccales.

1. **La mélanose de DUBREUIL** (45-46) :

Au niveau 1, l'hyperplasie des mélanocytes réalise une image très particulière d'alternance de mélanocytes et de kératinocytes dans un rapport de 1 sur 1. A ce stade, les mélanocytes présentent quelques anomalies avec apparition de grandes vacuoles claires dans le cytoplasme et diminution de la longueur des dendrites (Pl. VII, fig. 1).

D'autre part, une certaine activité villositaire apparaît au pôle basal. Il est curieux de constater que ce n'est pas la pigmentation des kératinocytes qui donne la couleur noire à la mélanose de DUBREUIL, mais l'abondance extraordinaire du pigment absorbé par les macrophages du derme superficiel. A ce stade, les mélanosomes ne sont pratiquement pas différents des mélanosomes de mélanocytes normaux. Ils sont peut-être plus volumineux et plus allongés. Lorsque les thèques se forment, la rupture des rapports mélanocytes-kératinocytes est évidente et les mélanocytes du centre de la thèque ne rejettent plus leur pigment. Un certain nombre d'anomalies de structures du mélanosome apparaissent : mélanosome à centre clair, constitution de mélanosomes composés dans le cytoplasme de mélanocytes. Ce point est très important car il a été qualifié de spécifique de la malignité par MISHIMA. Par endroits, la membrane basale est errodée par les prolongements microvillositaires des mélanocytes et elle n'est plus soutenue par les kératinocytes qui ont été écartés.

Les ruptures de cette membrane basale apparaissent et lorsque les mélanocytes sont malins, on assiste à l'envahissement du derme papillaire. Dès l'envahissement du derme papillaire, et à plus forte raison lors des niveaux 3 et 4, les mélanosomes deviennent extrêmement anormaux avec cassure de la protéïne, plicatures et extrême inégalité dans les tailles et dans les maturations. Il est intéressant de souligner que les anomalies de mélanosomes accompagnent la disparition des relations normales avec les kératinocytes et cela soulève le problème de la maintenance d'une structure complexe par des rapports normaux intercellulaires (Pl. VIII et IX).

2. **Le mélanome superficiel envahissant :**

L'examen des thèques intra-épitétiales des mélanomes malins envahissants révèle l'existence de perturbations profondes des rapports mélanocyte-kératinocyte. Les mélanocytes ne présentent pas de micro-villosité et l'érosion de la membrane basale est rarement observée à distance des zones d'nvahissement. Les mélanosomes sont très arrondis en forme de ballon de football et la protéïne de structure décrit des spirales dont l'opacification est très incomplète. Un grand nombre de ces cellules sont donc, au microscope photonique, achromiques. Les macrophages du derme ne contiennent pratiquement pas de mélanine. Le mélanosome du mélanome malin envahissant est spécifique. Nous ne retrouvons pas toutes les anomalies de rupture de protéïne décrites dans les autres cas, car la maturation des mélanosomes et l'organisation cristalloïde s'arrêtent très précocément.

3. **Le mélanome nodulaire :**

Les anomalies des mélanosomes sont majeures. Tout peut se voir et le polymorphisme du mélanosome est poussé à son maximum. Certaines cellules arrêtent leur synthèse très tôt, d'autres la poussent à leur terminaison, mais la forme est absolument anarchique.

Il nous paraît donc possible, dans une certaine mesure, en présence d'un mélanome de niveaux 3, 4 ou 5, quelle qu'en soit son origine, de déterminer la forme de départ.

4. **Les mélanomes achromiques :**

L'ultrastructure permet de retrouver des structures spécifiques des mélanosomes dans les mélanomes achromiques. En effet, deux types ont été individualisés :

a) Type arrondi : il s'agit de grandes vésicules à contenu granuleux, denses aux électrons, sans aucune structure protéïque visible. Le cytoplasme péri-nucléaire est envahi par ces vésicules dont la morphologie est assez spécifique.

b) Le deuxième type est constitué par des structures très rares, contenant une protéïne cristallisée, identique au pré-mélanosome strié et, dans ce cas, le diagnostic est évident.

Au microscope électronique, le diagnostic de mélanome malin qu'il soit pigmenté ou achromique, est donc certain.

On concevra le grand intérêt de ces données quand on connaît la fréquence avec laquelle les biopsies sont pratiquées à la légère sans contrôle histologique.

La survenue d'une adénopathie d'apparence primitive dans les années suivant l'ablation, sans contrôle d'une tumeur cutanée, pose de nombreux problèmes que la microscopie électronique peut résoudre.

V. — LES DONNEES ACTUELLES DE L'IMMUNOLOGIE (80-81)

L'immunofluorescence pratiquée sur des cellules de mélanomes en culture, ou en suspension, est un domaine en pleine évolution. Nous avons pensé utile de donner les résultats récents obtenus avec cette technique.

1. **Néo-antigène cytoplasmique :**

Il y aurait actuellement, et toutes les écoles sont du même avis, dans le sang circulant des malades porteurs de mélanomes malins, des anticorps dirigés contre un constituant cytoplasmique présent dans les mélanocytes malins et absents dans les mélanocytes normaux.

L'imprécision de la méthode ne permet pas de localiser avec exactitude cette immunofluorescence et de la rapporter à un organelle particulier. Le mélanosome ne semble pas en cause et la nature de la substance antigénique n'est pas connue. Ce néo-antigène cytoplasmique est mis en évidence par immunofluorescence directe et par réaction croisée.

PLANCHE VII

Hyperplasie mélanocytaire

Figure 1 : Sur ce cliché, au microscope électronique, on voit au-dessus d'une basale épidermique bien conservée, deux mélanocytes (M) entre des cellules épithéliales (C E). Ces différentes cellules ont des noyaux (N) normaux. On distingue quelques mélanosomes dans les mélanocytes. Dans le derme superficiel, des vaisseaux (V). Dans les mélanocytes, des vésicules (v) électroniquement vides.

Figure 2 : Au contact immédiat de la membrane basale (flèche claire), un amas de mélanocytes sans interposition de kératinocytes. Ce sont des aspects que l'on rencontre dans le mélanome « in situ ».

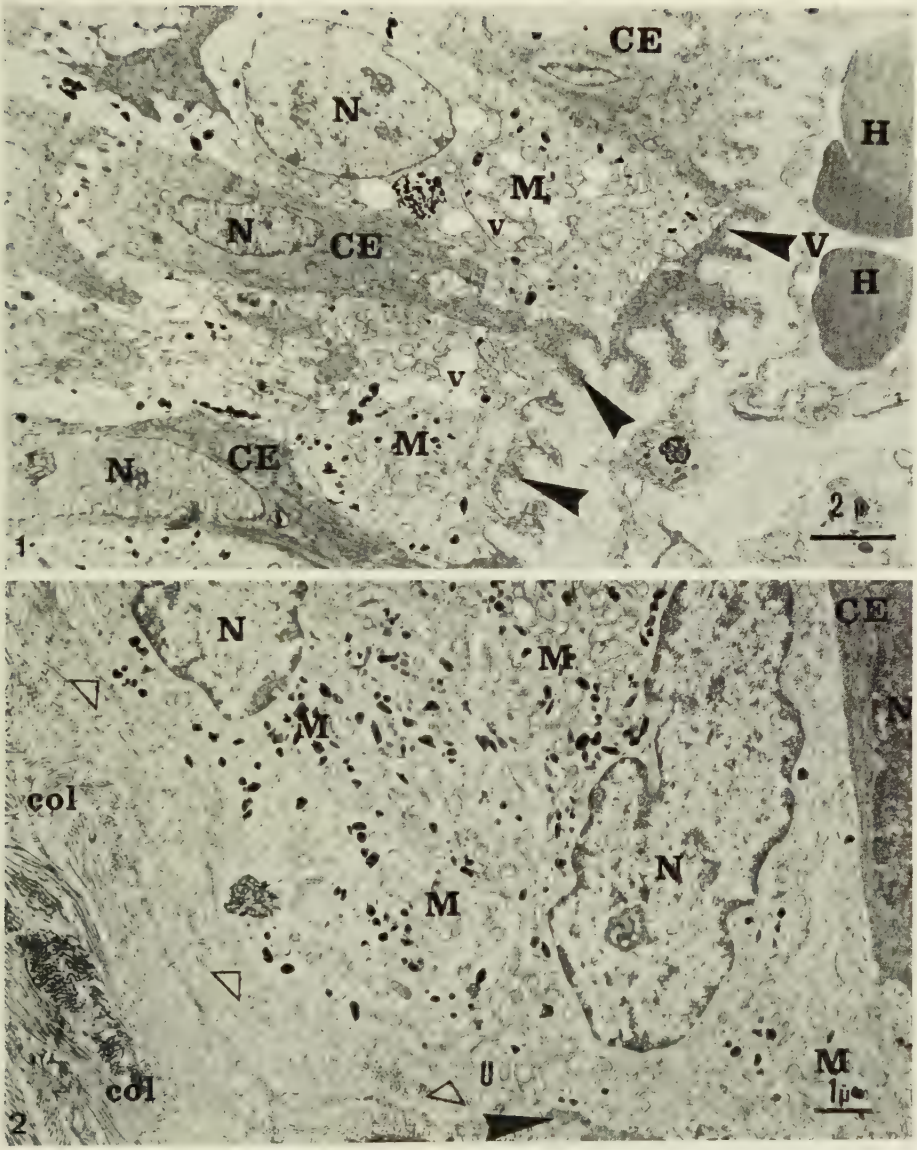

CE
N
H
M
N
CE
V
H
V
M
N
CE
2 µ
1
N
M
M
CE
N
col
N
M
col
M
1µ
2

PLANCHE VIII

Différents types cellulaires dans la « zone frontière »

Figure 3 : Dans le derme superficiel, un macrophage qui contient dans des phagosomes de nombreux mélanosomes complexes.

Figure 4 : Au milieu de kératinocytes (C E), un mélanocyte « ascensionnel ». Il est séparé de la basale par les kératinocytes.

Figure 5 : Au contraire, un mélanocyte malin à noyau encoché, en rétention de mélanosomes atypiques, au-delà de la basale, dans le derme papillaire.

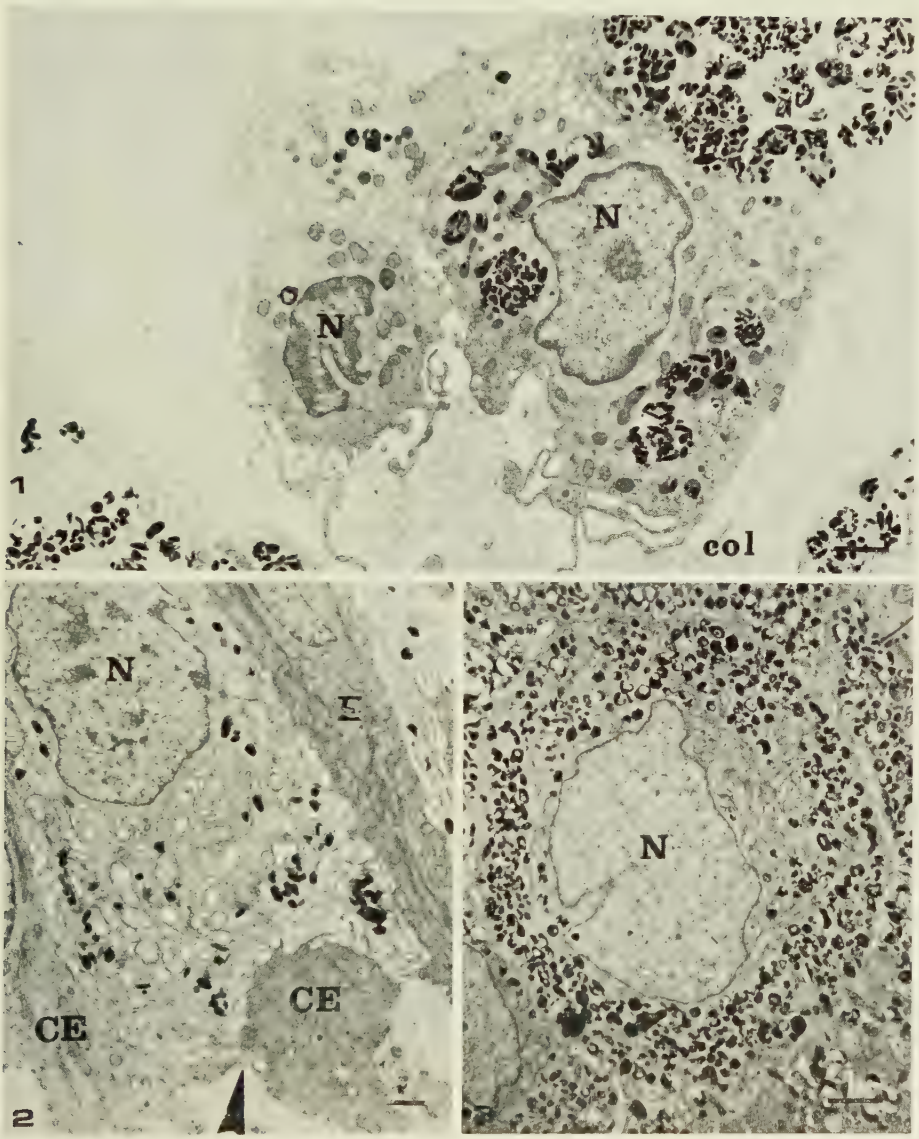

N
N
1
col
N
CE
CE
2
N
3

PLANCHE IX

Les différents aspects de mélanosomes atypiques

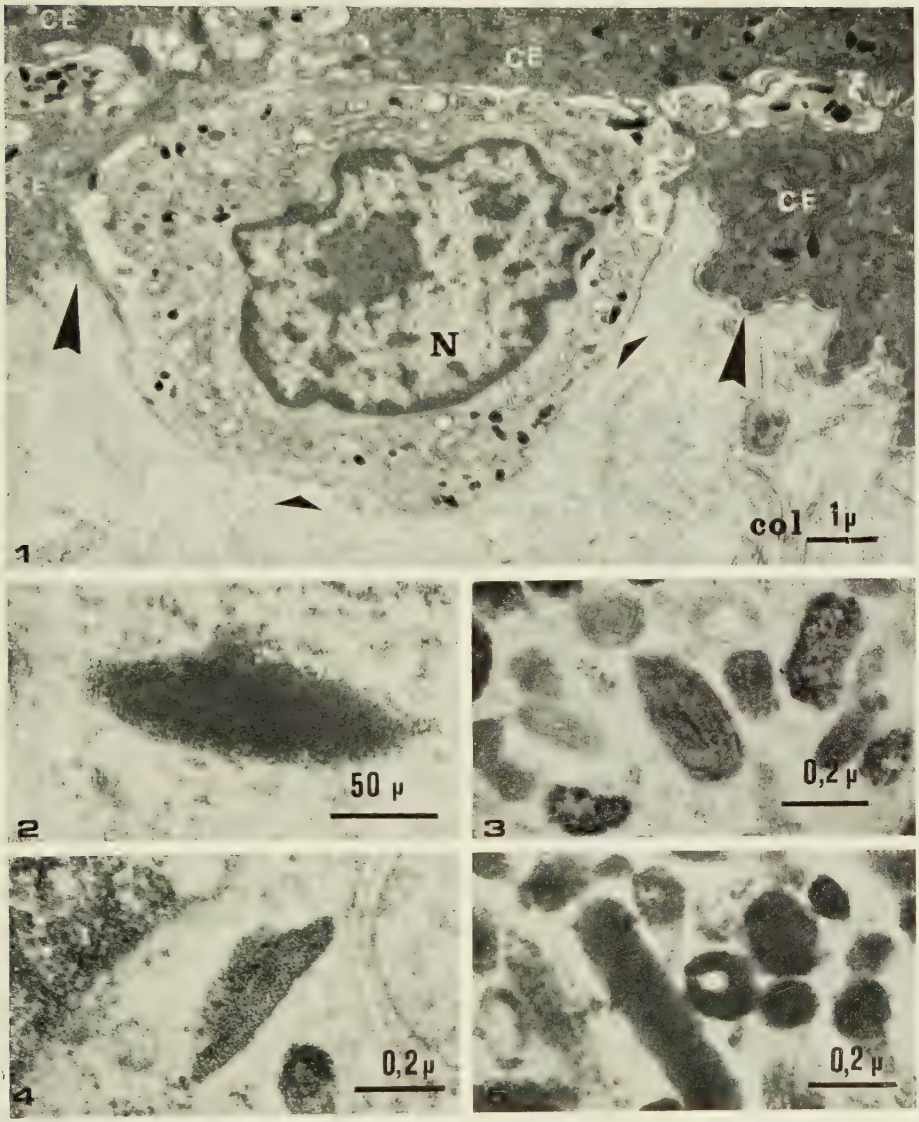
Figure 6 : Un mélanocyte normal au contact de la membrane basale, entouré de kératinocytes. Les mélanosomes sont rares et normaux.

Figure 7 : Un mélanosome normal, mature.

Figure 8 : Mélanosome dont l'opacification est incomplète.

Figure 9 : Mélanosome de forme irrégulière avec des irrégularités de la protéine.

Figure 10 : Mélanosomes en « cocarde », immatures, en « bâton » ou en forme de « cigare ».


CE
CE
CE
N
col
1µ
1
50 µ
2
0,2 µ
3
0,2 µ
4
0,2 µ
5

On conçoit l'importance de ces résultats si tout sérum de malade, suspecté être porteur d'un mélanome malin, donnait une réaction positive avec des cellules de mélanome malin en culture, maintenues en souche continue !

2. **Néo-antigène de surface :**

Les résultats concernant la présence d'un néo-antigène de surface sont beaucoup plus discutables.

Ce néo-antigène de surface n'est que rarement retrouvé et de plus amples investigations sont nécessaires pour éclaircir ce point particulier. Quoi qu'il en soit, le mélanome malin déclenche chez son porteur un statut immunologique particulier que la microscopie optique avait déjà constaté (infiltrat inflammatoire lympho-plasmocytaire des niveaux 3 et 4) et qui est confirmé actuellement par les résultats d'immunofluorescence.

VI. — LES DONNEES BIOCHIMIQUES ACTUELLES (79)

Les études sur la mélanine sont déjà très anciennes ,mais la constitution intime du mélanosome et en particulier de sa protéïne de soutien est l'objet actuel des recherches, en particulier dans le laboratoire du C.R.A.C.M.

L'immunochimie et la chimie moléculaire donnent des espoirs certains et nous verrons ce qu'il en est.

Ainsi, les résultats des travaux récents sur le mélanome sont loin d'être négligeables et font voir, sous un jour différent, cette tumeur.

Mais bien des inconnues restent et c'est l'objet de notre recherche que d'apporter notre contribution pour éclaircir si possible certains points.

DEUXIEME PARTIE

Matériel et moyens d'étude

Le Groupe Mélanome du Service de Recherche du C.R.A.C.M. a, depuis plusieurs années, mis en route des protocoles divers pour l'étude biologique de cette tumeur.

Dans ce cadre, le Service d'Anatomie Pathologique devait procéder à l'examen anatomo-pathologique, ultrastructural et cytologique des différentes expérimentations. Nous avons donc bénéficié d'un matériel important sur des centaines d'animaux.

Nous envisagerons dans cette deuxième partie :

— Chap. I : Les animaux utilisés

— Chap. II : L'origine des tumeurs expérimentales

— Chap. III : Les techniques mises en œuvre pour notre étude

CHAPITRE I

Les animaux

I. — LES HAMSTERS

Les hamsters utilisés dans les différentes expérimentations appart'ennent tous à l'élevage de l'animalerie du C.R.A.C.M. Il en existe deux variétés, provenant de la même souche d'origine (Pl. X, fig. 1).

A. — **Le Hamster doré** (Cricetucus Auratus) provient d'une souche syrienne qui nous a été transmise par le Pr FRIEDMAN, de l'Institut de Recherches de la Faculté de Médecine de Paris, à l'Hôpital Saint-Louis

Au départ, en janvier 1966, cinq couples furent utilisés et, au mois de février 1966, les premières inoculations furent faites sur des nouveau-nés. Actuellement, en juillet 1971, l'animalerie a produit 6.000 hamsters dont 5.757 ont été mis en expérience, à partir des cinq couples qui avaient été réservés à la reproduction.

B. — **Le Hamster « Albinos » :** au cours de la reproduction des hamsters dorés est apparue, en 1967, une portée de hamsters dépigmentés, entièrement blancs, sauf le bout des oreilles qui sont noires (Pl. X, fig. 1).

Cette portée de 2 femelles et de 2 mâles a donné par accouplement « incestueux », dès la deuxième génération, des animaux Albinos. Ayant eu deux couples ,il y a deux lignées A et B.

Par la suite, la production d'animaux dépigmentés s'est effectuée normalement et dès la première génération produite par des Albinos frères et sœurs, on a obtenu uniquement des descendants apigmentés. L'élevage en est actuellement à la 10e génération sans aucune variation et sans que l'on retrouve de hamsters dorés.

PLANCHE X

Les animaux

Figure 1 : Les deux souches de hamsters syriens, l'un « doré », l'autre # albinos.

Figure 2 : Un hamster syrien « doré » et à côté le matériel nécessaire à l'injection du DMBA, une seringue et une petite sonde en plastique.

Figure 3 : La façon de tenir le hamster et l'inoculation du DMBA.

Figure 4 : Les tumeurs induites par le DMBA, sous-cutanées.

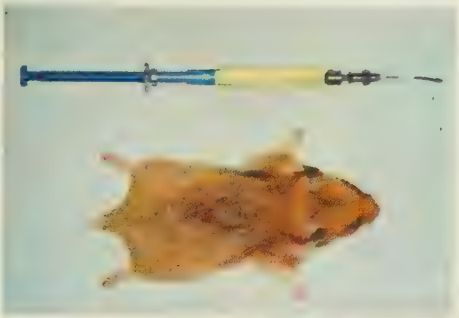
Figure 5 : Le mélanome « MOORE » transplantable (3e série) : aspect clinique comparatif avec le mélanome DMBA.

Figure 6 : Le mélanome « MOORE » (3e série) : aspect d'une tumeur transplantable en cours d'exérèse.

Figure 7 : Mélanome ano-vulvaire d'une jument grise (Obs. X).

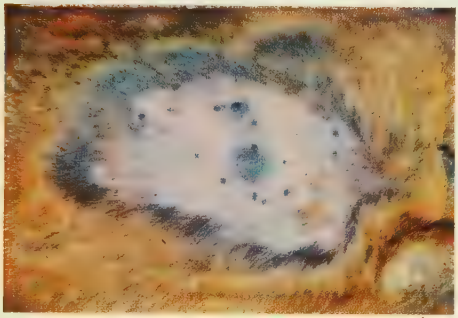
Figure 8 : Envahissement métastatique des ganglions mésentériques (Obs. X).

1



2

3

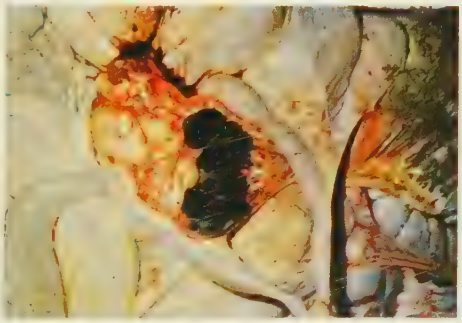


4

5

6

7



8

Cette varité est certainement très intéressante pour des expérimentations sur le mélanome, puisque cet animal présente un trouble de la mélanogénèse, très certainement par une modification génétique qui empêche la fabrication de la mélanine au niveau des poils et des téguments.

II. — LES CHEVAUX

Le vétérinaire-inspecteur des Abattoirs de Marseille porte un grand intérêt aux tumeurs animales et demande souvent le concours du Service de Recherces. C'est grâce à lui que nous avons pu avoir entre autres tumeurs animales, des « tumeurs noires » du cheval.

C'est à dessein que nous utilisons cette dénomination, car c'est un des problèmes qui nous a paru intéressant de tenter d'élucider que celui de leur potentiel évolutif. La question est fort débattue entre les tenants de la « mélanose » et ceux du « mélanome ».

Pendant ces 17 derniers mois, 11.549 chevaux ont été abattus à Marseille, dont 2.000 chevaux de robe blanche.

Parmi ceux-ci, il y a eu 16 « tumeurs noires », mais nous n'avons eu à en examiner que 11.

Tous avaient une robe blanche, pommelée ou légèrement mouchetée, et ils provenaient tous d'Europe Centrale et de l'Europe de l'Est, en particulier de Yougoslavie (Pl. X, fig. 7).

Pour la plupart d'entre eux, il s'agissait d'une découverte, à l'examen habituel systématique de l'inspection vétérinaire des viandes destinées à la consommation.

Les premiers animaux n'eurent qu'un simple examen macroscopique ou histologique. Par la suite, comprenant tout l'intérêt du problème, M.-G. DURAND a recherché systématiquement, sur les animaux vivants, la possibilité d'une tumeur mélanique et, de ce fait, plusieurs furent diagnostiquées.

Etant prévenus avant l'abattage des animaux suspects, nous avons pu entreprendre une étude plus approfondie et plus systématique tant au point de vue morphologique que biologique et biochimique, d'autant plus que la masse tumorale, si importante le plus souvent, dépassant le kilogramme, donne aux biochimistes des possibilités qu'ils ne peuvent trouver chez l'homme.

La question qui est à résoudre est de savoir si l'on pourra intégrer de l'animal à l'homme.

CHAPITRE II

Origine des tumeurs

Les tumeurs « noires » que nous avons eu à examiner provenaient, comme nous l'avons dit, soit des hamsters avec deux variétés, l'une spontanée, l'autre chimio-induite, soit de découvertes à l'abattage de chevaux.

Nous allons voir pour chaque type tumoral les conditions dans lesquelles les prélèvements ont été faits.

— I —

MELANOME SPONTANE DU HAMSTER

En réalité, nous devons préciser exactement l'origine de la souche transplantable que nous avons eue à notre disposition.

C'est FORTNER (65-66) qui, le premier, a décrit et étudié le mélanome spontané du hamster pour lequel il a réussi des transplantations et une mise en culture permettant l'établissement d'une lignée continue.

Cette souche a été transmise à MOORE, du Rosewell Park Memorial Institute de Buffalo, qui a eu l'amabilité de l'envoyer au laboratoire de recherches du C.R.A.C.M. Cette souche M.M. = 2 culture 87.341 a été dénommée dans le service, pour la facilité d'expression, le « mélanome Moore ».

Ce mélanome a eu quelques tribulations qui, comme souvent cela se produit dans les études expérimentales, ne sont pas sans intérêt.

Une première série de transplantations s'est effectuée normalement avec 14 passages jusqu'au jour où tous nos animaux en expérience furent tués par un coup de chaleur consécutif, pendant un week-end, à un appareil électrique mis en circuit dont le thermostat n'a pas fonctionné.

A partir de deux tumeurs de la première série (premier passage) mise en culture, une deuxième série fut mise en route pour laquelle on a eu

18 passages. Mais cette série, à l'examen histologique, s'est vite avérée très différente des tumeurs de la série précédente et nous verrons ce qu'il faut en penser.

Aussi une troisième série fut mise en route en partant cette fois de la lignée 87.341 Moore, la 9e sub-culture n'ayant pas été passée sur l'animal et conservée en azote liquide. Cette série nous a donné quelques surprises histologiques.

Nous allons examiner en détail chacune de ces trois séries.

A) **Première série du mélanome « Moore » transplantable** (Tableau I) :

La souche 87.341 envoyée par avion par MOORE des U.S.A. (Buffalo) est parvenue le 18 novembre 1968. Le 26 du même mois la première inoculation fut faite à partir de la première sub-culture.

Pour cette première série, qui a comporté 14 passages, les 84 hamsters ont été inoculés à l'âge adulte par voie sous-cutanée.

Les tumeurs sont apparues entre 11 et 34 jours, en moyenne 18 jours.

Les hamsters porteurs de tumeurs, qui n'ont pas été sacrifiés, sont morts entre le 25e et le 81e jours, après l'inoculation, en moyenne 47 jours.

La production tumorale est la suivante :

Hamsters inoculés	Tumeurs	Pas de tumeur
84	76	8*

(*) Sur les 8 animaux sans tumeur, 3 sont morts en moins de trois semaines et les 5 derniers sont morts au 7e jour de l'inoculation en raison de l'accident de chauffage.

On doit également souligner que pour les 4 premiers passages, les inoculations se sont faites sur des hamsters albinos et sur des hamsters dorés, sans que l'on observe une incidence tumorale particulière.

Aussi, à partir du 5e passage, étant donné que notre lot de hamsters albinos est encore réduit, les passages se sont effectués uniquement sur les hamsters dorés.

B) **Deuxième série du mélanome « Moore » transplantable** (Tableau II) :

Cette série a été faite à l'aide des tumeurs obtenues au cours de la première série H 3762 et H 3763, l'un albinos et l'autre doré, dont les tumeurs avaient été mises en culture.

Toutes les inoculations ont été faites par voie sous-cutanée, dorsale chez des animaux adultes. Les tumeurs sont apparues entre le 7e jour et le 35e jour, après l'inoculation, en moyenne le 18e jour.

TABLEAU I

PREMIERE SERIE MELANOME « MOORE »

(26-11-68 au 26-1-70)

Passages	Nombre de cellules Trypsinées	Origine des cellules	Histologie	M. E.	Hamster	Type du hamster	Sexe	Date
1er	1. 10^6	1er		+	H 3.762-63	A + D		26-11-68
2me	2. 10^6	T. H. 3.763	44.972 à 80		H 3.860 à 65	A + D	F	10-01-69
3me	10^6	T. H. 3.863	45.172 à 77		H 3.873 à 80	A + D	M	03-02-69
4me	5. 10^5	T. H. 3.873	45.575 à 80		H 3901 à 08	A + D	F	05-03-69
5me	5. 10^5	T. H. 3.902	46.090 à 95	+	H 3.943 à 52	D	M	10-04-69
6me	5. 10^5	T. H. 3.944	46.856 à 62		H 4.019 à 27	D	M	13-05-69
7me	5. 10^5	T. H. 4.024	47.265 à 71		H 4.039 à 48	D		05-06-69
8me	5. 10^5	T. H. 4.040	47.634 à 40	+	H 4.048 à 93	D	M	10-07-69
9me	5. 10^5	T. H. 4.091	48.386 à 92	+	H 4.253 à 57	D	F	07-08-69
10me	5. 10^5	T. H. 4.253	48.580 à 86	+	H 4.264 à 68	D	M	25-09-69
11me	2. 10^5	T. H. 4.265	49.075 à 81	+	H 4.302 à 06	D	M	24-10-69
12me	2. 10^5	T. H. 4.304	49.727 à 32	+	H 4.327 à 29	D		20-11-69
13me	2. 10^5	T. H. 4.328	50.276 à 82	+	H 4.379 à 81	D	F	18-12-69
14me	2. 10^5	T. H. 4.380	51.205 à 211		H 4.441 à 45	D		26-01-70

Cette expérimentation a été interrompue par un accident de chauffage qui a tué tous les animaux en expérience.

A : hamster albinos
D : hamster doré

TABLEAU II

DEUXIEME SERIE MELANOME « MOORE »

(3-2-70 au 12-7-71)

Passages	Nombre de cellules Trypsinées	Origine des cellules	Histologie	M. E.	Hamster	Type du hamster	Sexe	Date
2me	10^6	9me Sub. T. H. 3762-63	44.972 à 80	+	H 4.486 à 90	D	M	03-02-70
3me	2. 10^5	T. H. 4.486	52.287 à 92		H 4.555 à 59	D	F	03-03-70
4me	2. 10^5	T. H. 4.555	53.626 à 32	0	H 4.690 à 93	D	F	14-04-70
5me	2. 10^5	T. H. 4.690	53.512 à 17	+	H 4.825 à 30	D		26-05-70
6me	2. 10^5	T. H. 4.830	55.009 à 14	+	H 4.850 et 51	A		19-06-70
7me	2. 10^5	T. H. 4.851	55.045 à 50	+	H 4.879 et 80	D	M	23-07-70
8me	2. 10^5	T. H. 4.879	55.506 à 11	0	H 4.890 à 93	D	M	19-08-70
9me	2. 10^5	T. H. 4.890	56.224 à 29	+	H 4.923 à 26	D		25-09-70
10me	10^5	T. H. 4.926	57.469 à 74	+	H 5.009 à 12	D		28-10-70
11me	10^5	T. H. 5.010	57.954 à 60	+	H 5.109 à 12			26-11-70
12me	2. 10^5	T. H. 5.109	58.682 à 87	+	H 5.135 à 38		M	15-12-70
13me	3. 10^5	T. H. 5.135	59.430 à 44	+	H 5.174 à 78		F	13-01-71
14me	4. 10^5	T. H. 5.175	60.086 à 91		H 5.258 à 62			05-02-71
15me	6. 10^5	T. H. 5.228	61.107 à 12		H 5.321 à 23			10-03-71
16me	2. 10^5	T. H. 5.321	61.899 à 04		H 5.397 à 400			14-04-71
17me	2. 10^5	T. H. 5.400	62.954 à 60		H 5.523 à 27			27-05-71
18me	2. 10^5	T. H. 5.523	63.440 à 44		H 5.573 à 76			18-06-71
19me	2. 10^5	T. H. 5.573	.. ..		H 5.721 à 32			12-07-71

TABLEAU III

TROISIEME SERIE MELANOME « MOORE »

(du 7-9-70 au 2-7-71)

Passages	Nombre de cellules Trypsinées	Origine des cellules	Histologie	M. E.	Hamster	Type du hamster	Sexe	Date
1er	5. 10^5	9me Subculture « MOORE »			H 4.917 à 19			07-09-70
2me	2. 10^5	T. H. 4.917	56.262 à 67	+	H 4.930 à 32			30-09-70
3me	10^5	T. H. 4.932	57.487 à 92	+	H 5.013 à 16			28-10-70
4me	10^5	T. H. 5.013	57.960 à 65	+	H 5.105 à 108			26-11-70
5me	2. 10^5	T. H. 5.105	58.843 à 48	+	H 5.145 à 48		F	22-12-70
6me	4. 10^5	T. H. 5.145	59.545 à 50	+	H 5.222 à 27			19-01-71
7me	3. 10^5	T. H. 5.225	60.715 à 19		H 5.297 à 301		F	24-02-71
8me	4. 10^5	T. H. 5.301	62.125 à 30		H 5.417 à 22			22-04-71
9me	4. 10^5	T. H. 5.417	63.734 à 39		H 5.477 à 78			11-05-71
10me	4. 10^5	T. H. 5.477	63.148 à 53		H 5.557 à 61			07-006-71
11me	2. 10^5	T. H. 5.558			H 5.655 à 61			02-07-71

Les hamsters porteurs de tumeurs qui n'ont pas été sacrifiés sont morts entre 28 jours et 57 jours après l'inoculation, avec une moyenne de 34 jours.

Les 17 passages (les derniers étant trop récents) de cette deuxième série ont donné pour 69 animaux en expérience, 68 tumeurs. Un hamster a été trouvé mort au bout de 22 jours, en partie dévoré, peut-être avait-il une tumeur.

Seul le 6e passage a été fait sur un albinos sans incidence sur le processus tumoral.

Pour presque tous les passages, une étude histologique, ultrastructurale et une mise en culture a été faite.

C) **Troisième série du mélanome « Moore » transplantable** (Tableau III) :

Etant donné les aspects histologiques très « inattendus » de la deuxième série expérimentale, un troisième essai a été fait pour tenter de retrouver la souche, telle que nous l'avions eue avec les cellules à leur arrivée (première série interrompue par accident).

On a utilisé la 9e sub-culture de la souche M.M. = 2 culture 87.341 envoyée du Rosewalt Park Memorial Institute de Buffalo, qui avait été conservée en azote liquide.

Toutes les inoculations ont été faites par voie sous-cutanée, dorsale chez des animaux adultes.

Les délais d'apparition des tumeurs varient entre 15 et 34 jours, en moyenne 21 jours 1/2.

Le temps écoulé entre l'inoculation et la mort, quand les hamsters n'ont pas été sacrifiés, oscille entre 36 et 56 jours, avec uen moyenne de 50 jours.

Pour les 10 premiers passages, le 11e étant trop récent, on a obtenu 40 tumeurs sur 42 animaux mis en expérience. Les deux hamsters n'ayant pas eu de tumeur sont morts 14 jours après leur inoculation, d'accident anesthésique pour un essai de greffe de peau entre eux.

D) **Calcul de la dose tumorale 50 % (D.T. 50) :**

Ayant obtenu des tumeurs par transplantation directe, afin d'avoir des données exactes pour faire un essai thérapeutique valable, selon le procédé de R. LATARJET, par extraits tumoraux autologues irradiés aux rayons ultraviolets, on devait déterminer la dose tumorale 50 %.

La première série d'expériences en était alors à son 2e passage. Trois protocoles ont été réalisés.

TABLEAU IV

Type de hamster	Origine des cellules tumorales	Doses de cellules tumorales inoculées et résultats							
		10^3 Cellules		10^4 Cellules		10^5 Cellules		10^6 Cellules	
		H	T	H	T	H	T	H	T
Dorés	Cellules cultures de souche 87.341	4	3	4	4	5	5	5	5
Albinos ...	Idem.	5	0	5	5	5	4	5	3
Dorés	Cellules 3me sub-culture souche 87.341	5	0	5	0	5	4		

Dans cette épreuve, 53 hamsters ont été inoculés et l'on a obtenu 29 tumeurs qui firent toutes l'objet d'un examen histologique.

E) Etude comparative du pouvoir tumorigène des cellules irradiées et non irradiées aux U.V. :

En vue d'un essai thérapeutique à visée immunologique, il était nécessaire de connaître les doses de rayons ultra-violets empêchant la reproduction tumorale d'une part, et celles qui, par ailleurs, empêchent la replication d'un éventuel virus défectif.

Voici le tableau de cette épreuve :

TABLEAU V

N° Hamster	Dose cellule tumorale Hamster 4.070	Histologie	Irradiations U. V.	Sexe	Tumeur
4.224	5. 10^5	49.030	0	M	+
4.225	5. 10^5	49.016	0	M	+
4.226	5. 10^5	49.624 à 28	3.000 ergs	M	0
4.227	5. 10^5	49.629 à 633	3.000 ergs	M	0

D'après ce tableau, on voit que l'action des rayons ultra-violets à la dose de 3.000 ergs par mm^2 supprime tout le pouvoir tumorigène.

F) **Les tumeurs transplantées mises en culture** (Tableaux VI - VII et VIII) :

Pour la plupart des tumeurs transplantées, lors de l'ablation de celles-ci, chaque fois une mise en culture a été faite en vue de leur conservation en azote liquide. Ces cultures ont été examinées cytologiquement au cours de la culture, au microscope inversé et également pour un grand nombre en microscopie optique après coloration et au microscope électronique.

Nous donnons ci-dessous les tableaux des cultures qui furent exécutées dans les trois séries du mélanome transplantable de MOORE.

La plus grande partie de ces cultures ne furent pas poursuivies. Lorsqu'elles étaient florides, elles étaient mises en azote liquide, ce qui permet d'avoir en réserve des cellules tumorales pour de nouvelles expérimentations.

EN RESUME

Sans tenir compte de la dernière expérience, l'ensemble de ce travail qui est encore en cours nous a donné un matériel tumoral très important : 249 animaux ont été inoculés et l'on a obtenu 213 tumeurs.

Chaque tumeur a fait l'objet d'un examen systématique histologique. Dans chaque série d'essais, de nombreux prélèvements ont donné lieu à un examen au microscope électronique.

La culture des tumeurs obtenues a toujours été faite dans chaque expérience et ces cultures sont conservées en azote liquide. Cette précaution a, du reste, permis, dans un accident de chauffage d'animalerie, de reprendre une expérience en cours.

Au point de vue immunologique, la recherche des néo-antigènes a été également faite. Le caryotype des cellules tumorales a été suivi.

Tout dernièrement, enfin, les tumeurs mélaniques de hamster ont été examinées à l'aide des isotopes radio-actifs.

TABLEAU VI

MISES EN CULTURE PREMIERE SERIE SOUCHE MOORE 87.341

Cellules mises en culture	Milieux	Numéro du passage	Date	Nombre subculture	Numéros examens cytologiques	Microscope électronique
S. 87.341	EAGLE		21-11-68	34	13.337 - 13.471 - 13.473 13.538 - 13.652 - 45.756 46.106 - 46.712 - 47.083 47.995 - 48.521 - 50.119	1.442 - 1.445 - 1.514 1.523 - 1.599 - 2.311 2.312 - 2.338 - 2.339 ***
TH. 3.762 A*	»	1er	13-1-69	8	13.504 - 13.534 - 13.601 13.660 - 45.935 - 47.335 53.804	1.474 - 1.475 - 1.476 1.477 - 1.478 - 1.490 1.491 - 1.516 - 1.527
TH. 3.763 D**	»	1er	17-1-69	5	13.536 - 13.531 - 13.603 13.650 - 13.659 - 45.755 46.485 - 46.715	1.481 - 1.482 - 1.483 1.488 - 1.489 - 1.528 1.600
TH. 3.861 D	»	2me	11-2-69	3	13.646 - 13.648 - 13.657 45.936 - 46.045 - 46.714	1.507 - 1.516 - 1.517
TH. 3.863 D	»	2me	10-2-69	5	13.655 - 13.644 - 13.658 45.937 - 46.046 - 46.175 46.485 - 46.917 - 47.338	1.508
TH. 3.873 D	»	3me	28-3-69	2	45.938 - 46.047	1.533 - 1.534
TH. 3.902 D	»	4me	8-5-69	4	46.411 - 46.750 - 46.920 47.334	1.540 - 1.566 - 1.567
TH. 3.929 D	»	4me	14-5-69	2	46.487 - 46.713	1.568 - 1.569
TH. 3.948 D	»	5me	18-6-69	3	47.084 - 47.114 - 47.337	1.601
TH. 3.950 D	»	5me	16-6-69	2	47.069 - 47.333	
TH. 4.021 D	»	6me	24-6-69	2	47.301 - 47.336	1.620
TH. 4.089 D	»	8me	11-8-69	2	48.011 - 48.151 - 48.328	1.703 - 1.620

*A : Hamsters Albinos. **D : Hamsters Dorés. *** : Coloration par le Rouge de ruthénium.

TABLEAU VII

MISES EN CULTURE DEUXIEME SERIE SOUCHE MOORE 87.341

Cellules mises en culture	Milieux	Numéro du passage	Date	Nombre subculture	Numéros examens cytologiques	Microscope électronique
TH. 3.762 D ..... TH. 3.763 D ..... Azote liquide	EAGLE	4me	11-6-70	2	53.840 - 53.978 - 54.200	
TH. 4.851 A	»	6me	28-7-70	2	54.943 - 55.130	2.266

TABLEAU VIII

MISES EN CULTURE TROISIEME SERIE SOUCHE MOORE 87.341

Cellules mises en culture	Milieux	Numéro du passage	Date	Nombre subculture	Numéros examens cytologiques	Microscope électronique
TH. 4.917 D	EAGLE	1er	6-10-70	1	56.314	2.332
TH. 5.106 D	»	3me	25-1-71	2	59.656	2.526 - 2.577 2.578 - 2.579*
TH. 5.145 D	MAC COY	4me	19-1-71	7	60.702	2.554

(*) Essais de l'action de l'Actinomycine D.

— II —

MELANOME CHIMIO-INDUIT PAR LE D.M.B.A. CHEZ LE HAMSTER

Le 9.10 Dimethyl 1.2 Benzanthracène (D.M.B.A.) est un carcinogène bien connu. Il a chez le hamster la propriété de donner, selon le mode d'administration, des tumeurs conjonctives, des tumeurs épithéliales et surtout des tumeurs du système mélanogène.

Dans le cadre des expérimentations en cours sur les essais thérapeutiques à visée immunologique dans les tumeurs mélaniques, toute une série de protocoles a été mise en œuvre.

Plusieurs conditions étaient à remplir :

— Obtenir des tumeurs pigmentées ;

— Bien connaître leur nature histologique et ultrastructurale pour en déterminer morphologiquement le caractère de bénignité ou de malignité ;

— Tenter la transplantation pour avoir une souche dont on puisse déterminer la dose tumorale 50 %.

A) Obtention des tumeurs pigmentées :

a) **Modalités d'administration du D.M.B.A. et doses utilisées :**

1. - *Technique de l'instillation* (Pl. X, fig. 2-3) :

Le D.M.B.A. se présente sous l'aspect d'une poudre jaune clair. Cette poudre est dissoute au « bain-marie » dans de l'huile d'olive.

La solution d'huile d'olive à injecter est aspirée dans une seringue de Hamilton. A son embout, est ajustée la sonde courbe, étroite, dont l'extrémité est renflée. Ce matériel prêt, on saisit l'animal de la main gauche, en le pinçant solidement entre pouce et index par la peau du cou ; les autres doigts maintiennent le repli cutané de toute la région dorsale.

Dans cette position, l'animal ne peut se débattre, mais il ouvre facilement la bouche et il est très aisé d'y introduire la sonde. Il ne reste plus qu'à repousser le piston de la seringue jusqu'à la graduation requise.

L'animal relâché est aussitôt très actif ; il se lèche et parcourt la cage de long en large comme auparavant.

2. - *Dose :*

La dose classiquement utilisée est de 1 mg pour 12 g de poids d'animal.

Or, comme nos animaux pèsent en moyenne 50 à 60 g, on instille par la sonde 5,5 mg de D.M.B.A. dans 1 ml d'huile d'olive.

3. - *Les animaux utilisés :*

Ce sont des hamsters dorés de Syrie de l'élevage du laboratoire qui sont mis en expérience à l'âge de six semaines qui correspond à l'âge adulte.

b) **Protocole :**

Le 16 novembre 1970, 30 hamsters (20 mâles et 10 femelles), tous âgés de six semaines (n° 5.029 à 5.058), sont instillés avec le D.M.B.A. aux doses indiquées, mélangé avec l'huile d'olive.

Le même jour, 10 hamsters (5 mâles et 5 femelles) (n° 5.059 à 5.068) reçoivent en instillation 1 ml d'huile d'olive. Cette série servant de témoin.

c) **Résultats :**

1° *Les tumeurs obtenues :*

Le 20 juillet 1971, soit huit mois après le début de l'expérimentation, le bilan est le suivant :

* *Hamsters ayant reçu du D M.B.A. :*

— 10 animaux sont morts (5.030 - 38 - 43 - 44 - 48 - 49 - 51 - 54 - 55 - 56).

Parmi eux, 7 ont eu une tumeur sous-cutanée et 1 une tumeur profonde. Nous devons noter cependant que pour 4 hamsters à tumeurs sous-cutanées, l'autopsie a été impossible, car ils avaient été dévorés en partie ou ils ont subi une nécrose cadavérique rendant l'examen histologique impossible.

— 20 animaux ayant reçu du D.M.B.A. sont vivants (5.029 - 31 - 32 - 33 - 34 - 35 - 36 - 37 - 39 - 40 - 41 - 42 - 45 - 46 - 47 - 50 - 52 - 53 - 57 - 58).

Parmi eux, 19 présentent une tumeur sous-cutanée, dont certaines ont été enlevées pour examens ou essais de transplantation.

** *Hamsters témoins ayant reçu uniquement de l'huile d'olive :*

Trois de ces animaux sont morts (5.064 - 65 - 68) ; ils ne présentaient macroscopiquement et histologiquement aucune tumeur (Examen C.R.A.C.M. 62.113 à 117).

2° *Nature des tumeurs obtenues :*

Nous verrons par ailleurs la description histologique et ce que l'on peut en penser ; notons simplement ici les caractères généraux de ces néoformations.

Tumeurs chromiques		Tumeurs achromiques
Sous-cutanées ...	23	3
Profondes	0	1

* *Les tumeurs chromiques :*

Les hamsters H. 5.045 et H. 5.047 ont eu une exérèse de leur tumeur et ont donné lieu aux examens histologiques 61.677 et 61.678 qui révèlent des « tumeurs mélaniques ».

Les hamsters 5.030 - 43 - 48 - 51 n'ont pu être examinés (animaux dévorés par leurs congénères) ; ils portaient de leur vivant des petites tumeurs noires, de la taille d'une lentille semblable à celles qui furent examinées (5.045 et 5.047).

** *Les tumeurs achromiques :*

Les hamsters H. 5.038 - 55 et 56 ont fait des tumeurs sous-cutanées macroscopiquement achromiques (examens histologiques 61.079 à 83, 59.158 à 163 et 60.764, 61.087, 61.088, 61.222, 61.227).

Le hamster H. 5.054 a fait une tumeur profonde au niveau de la rate (examen histologique 58.297 à 302).

Ces tumeurs achromiques se révèlent histologiquement comme étant des sarcomes.

B) Essais de transplantation des tumeurs obtenues par le D.M.B.A. :

Si l'induction tumorale par l'instillation orale du D.M.B.A. a permis d'avoir actuellement 23 animaux porteurs de tumeurs ; par contre, nos essais de transplantations sont pour le moment, comme nous allons le voir, sans succès tout au moins pour les tumeurs pigmentées.

En ce qui concerne les tumeurs achromiques, la nature mélanocytique de celles-ci est fort peu probable.

Voici en raccourci l'étude des essais actuels qui furent faits selon deux techniques différentes, l'une étant une transplantation greffe à l'aide d'un trocart qui met en place dans le tissu cellulo-adipeux sous-cutané, un fragment tumoral, l'autre qui utilise la méthode habituelle dans les transplantations à savoir l'inoculation de cellules dissociées en suspension.

a) Les tumeurs pigmentées :

On a utilisé les tumeurs des H. 5.045 et H. 5.047, qui ont été contrôlées histologiquement, et celles du H. 5.052.

Etant donné le peu de volume de ces néoformations, on a également utilisé sans examen histologique des tumeurs absolument semblables macroscopiquement et obtenues dans les mêmes conditions, dans le même protocole expérimental.

Les animaux inoculés étaient soit normaux, soit préparés pour obtenir une irritation locale avec 3 injections intra-péritonéales de liquide de FREUND par semaine, pendant 3 semaines.

Le lieu d'injection a été soit le tissu sous-cutané, soit la poche jugale du hamster, réputée pour son absence de réaction immunologique de rejet.

Une seule fois on a utilisé une tumeur ayant poussé après transplantation (H. 5.412).

TABLEAU IX

ESSAIS DE TRANSPLANTATIONS TUMEURS PIGMENTEES

Hamster donneur	Trocart	Cellules dissociées	L. FREUND	P. JUGALE	T
H. 5.045	H. 5.376	1.7.10^5 C			0
Histo 61.677 .	H. 5.377	H. 5.372			0
		H. 5.373			0
					0
H. 5.047	H. 5.378	2.7.10^5 C			0
Histo 61.678 .	H. 5.379	H. 5.374			0
		H. 5.375			0
					0
H. 5.052	H. 5.423			5.10^5 C	0
				H. 5.424	0
H. 5.042			**H 5.412**		+
H. 5.040			H. 5.413		0
H. 5.412	H. 5.501	2.10^6 C			+
		H. 5.500			0
H. 5.033	H. 5.577				+

b) **Les tumeurs achromiques :**

La transplantation des tumeurs pigmentées, comme nous venons de le voir, s'avère délicate et difficile à réaliser.

Par contre, l'une des tumeurs achromiques H. 5.056 a déjà subi deux transplantations. Mais il s'avère que cette néoformation achromique est un sarcome induit par le D.M.B.A., et de ce fait facilement transplantable comme les sarcomes viro-induits qui sont suivis régulièrement dans le Service de Recherches du C.R.A.C.M. (5-89).

Dans le tableau ci-dessous on voit les différentes tumeurs obtenues :

TABLEAU X

ESSAIS DE TRANSPLANTATIONS TUMEURS ACHROMIQUES

Hamster donneur	Trocart	Histologie	Cellules dissociées	Cellules culture	Temps	Tum.
H. 5.055	H. 5.163				6 mois	0
Histo	H. 5.164				»	0
59.169	H. 5.165				»	0
	H. 5.166				»	0
H. 5.056	H. 5.318	62.258			50 jours	+
Histo	H. 5.319					0
61.087	H. 5.320	63.435			65 jours	+
61.088						
		61.146	H. 5.315 10^6		67 jours	+
		63.430	H. 5.316			0
			H. 5.317 2.10^6			
		63.446	H. 5.331		3 mois	0
			H. 5.332		3 mois	0
H. 5.038			H. 5.329 10^6	3.10^5		0
Histo		63.394	H. 5.330		21 jours	+
61.084						
61.085				5.370		0
		62.710		5.371		0
H. 5.318	H. 5.428		5.10^5			+
	H. 5.429				2 à 4	+
Histo	H. 5.430				semaines	+
62.258	H. 5.431					+
		63.531	H. 5.425			0
2ma passage			H. 5.426			0
			H. 5.427			0

C) Mise en culture :

a) Tumeurs pigmentées D.M.B.A. :

Les tumeurs enlevées par exérèse sur les hamsters 5.045 et 5.047, mises en culture par les techniques habituelles, n'ont pas donné de subculture ; il n'y a eu que des cellules en survie.

Les travaux actuels (non publiés) de J.-P. CESARINI montrent que la trypsination semble défavorable à ces néoformations et que les cultures doivent être faites en explant ou en cellules dissociées mécaniquement. Des travaux sont actuellement en cours pour mettre au point cette technique dans la section de culture de tissus mélanomes du Service de Recherches du C.R.A.C.M.

b) **Tumeurs achromiques :**

Par contre, les tumeurs des hamsters H. 5.056 et H. 5.038 ont donné lieu à des cultures avec subcultures (examens cytologiques 61.228 - 61.344), comme l'avait obtenu MOORE (Pl. XI et XII).

c) **Tumeurs humaines :**

La réunion du Groupe Mélanome de l'E.O.R.T.C. à Marseille, dans le laboratoire du Service de Recherches du C.R.A.C.M., a permis de faire une comparaison des souches de mélanomes malins humains entretenues dans les laboratoires de VIZA à Londres, de DE VRIES à Amsterdam, de DORE et KOURILSKY à Paris. Ces différentes souches nous permettront de faire une étude comparative avec nos cultures de tumeurs animales.

Il y a actuellement 3 souches de mélanomes humains entretenues au Laboratoire du C.R.A.C.M., qui est chargé de tenir le fichier des souches de mélanomes humains en lignée continue du Groupe Mélanome E.O.R.T.C., les unes poussant sur verre, l'autre en suspension.

* *Souches poussant sur verre :*

1. - Souche JOHNSON-R.P.M.I. 5.966, qui provient du Rosewell Park Memorial Institut de Buffalo, transmise par KOURILSKY, que nous avions eue en même temps que la souche 87.341 du hamster, mais qui avait mal supporté le voyage des U.S.A. à Marseille.
2. - Souche H.T 1.944 provenant du Sloan Kettering (Dr FOGH), transmise par KOURILSKY.

* *Souche poussant en suspension :*

Il s'agit de la souche S.K. Mel 1 ou Saltman, en provenance du Sloan Kettering (ŒTTGEN et coll.).

EN RESUME

Cette expérimentation, qui en est encore à sa phase de début, a porté sur 40 hamsters dorés qui, après injection de D.M.B.A., ont présenté 23 tumeurs pigmentées sous-cutanées qui s'avèrent être très difficilement transplantables sans dépression immunologique.

Par ailleurs, la culture de ces néoformations a été tentée sans succès. Les 4 tumeurs achromiques qui sont des sarcomes, sont transplantables au même titre que les mêmes tumeurs viro-induites par le polyome chez le hamster. Elles donnent facilement des cultures cellulaires.

Tout l'intérêt de cette expérimentation, comme nous le verrons, réside dans le potentiel évolutif des tumeurs pigmentées obtenues par le D.M.B.A.

— III

LES TUMEURS « NOIRES » DU CHEVAL

Les travaux de biochimie moléculaire sont très difficilement réalisables sur les mélanomes humains, car la quantité de tumeur n'est jamais très importante même dans les processus métastatiques, en dehors des rarissimes envahissements hépatiques que l'on n'a jamais immédiatement (il faut pour que les protéines ne soient pas dénaturées des prélèvements « in vivo »).

Comme, par ailleurs, l'équipe mélanome du C.R.A.C.M. appartient aux groupes O.M.S. et E.O.R.T.C. pour l'étude de cette tumeur, chaque fois que l'une de celles-ci est traitée, il faut une étude systématique histologique, ultrastructurale, immunologique après mise en culture. Il faut donc déjà une masse tumorale assez conséquente qui laisse très peu pour l'étude biochimique.

C'est pour cela que J.-P. KLEISBAUER s'est tourné vers un modèle animal qui lui apporterait un volume considérable de tumeur : le cheval. Les excellentes relations qu'il avait avec le vétérinaire inspecteur des viandes aux Abattoirs de Marseille, M.-G. DURAND, ont été bénéfiques.

Depuis 18 mois, chaque fois qu'un cheval abattu présentait une « tumeur noire » le Service de Recherches était averti.

Au début, de simples prélèvements furent pratiqués avec un simple contrôle histologique.

Par la suite, une étude plus poussée fut faite avec autopsie plus complète, prélèvement de sang pour caryotypes, étude histologique et ultrastructurale et mise en culture.

L'importance du matériel prélevé, qui allait parfois jusqu'à plusieurs kilogrammes, était indubitable.

C'est alors qu'une étude bibliographique approfondie de cette tumeur équine a fait apparaître de nombreuses divergences sur sa nature même. Pour cette raison et avant toute étude, nous avons adopté le terme de tumeur « noire » qui ne préjuge en rien de son potentiel évolutif (76-77-78-90-91-92).

Mais si l'on voulait que les travaux sur la structure moléculaire de la protéine de soutien du mélanosome soient applicables aux tumeurs humaines, il fallait mieux connaître cette néoformation tant au point de vue clinique, morphologique (optique et électronique), immunologique et culturale.

Une étude comparative avec les tumeurs du hamster dont nous avons détaillé les modalités d'apparition et avec certaines tumeurs humaines, pourra donner des éclaircissements valables et nous faire savoir si ce modèle expérimental doit être poursuivi.

A) Origine des chevaux porteurs de tumeurs « noires » :

Au cours de ces 18 derniers mois, 11.549 chevaux ont été abattus aux Abattoirs de Marseille, dont 16 présentaient des localisations mélaniques multiples ou uniques.

Nous n'avons eu à notre disposition que 11 de ces animaux atteints. Parmi ces animaux, 2.000 avaient une robe blanche, légèrement pommelée ou mouchetée. Ils provenaient tous d'Europe Centrale et de l'Europe de l'Est, en particulier de Yougoslavie.

Il n'a pas été noté de tumeur mélanique en dehors des chevaux blancs. Cette tumeur représente donc dans notre région une fréquence de 0,14 % pour l'ensemble des chevaux et de 0,8 % pour les animaux à robe blanche.

B) Les prélèvements effectués :

Dans le tableau IV nous avons résumé l'ensemble des examens faits sur ces chevaux. Les observations I et VIII ont eu uniquement des prélèvements pour l'étude biochimique.

Tous les autres ont eu au moins un examen histologique. Les observations II, III, V, VI et X, un prélèvement pour l'ultrastructure et, de plus, les observations II et III ont donné lieu à une étude au microscope électronique des culots de centrifugation différentiels des tumeurs.

Tableau XI : **CHEVAUX PORTEURS DE TUMEURS « NOIRES »**

Numéro observ.	Histologie	Microscopie électronique		Macroscopie	Photographies macroscopiques	Biochimie
		Tumeur	Culot			
I				+		
II	54.088	2.222 2.223 2.224	2.358 2.365	Ap névrose Généralisation		+
III	56.361	2.343 2.344				
IV	57.543			Fusées noires intra-musculaires Généralisation		
V	60.102	2.602 2.603		Aspects infiltrants généralisés	+	
VI	60.127	2.607				
VII	60.816 à 820			Localisations muscle myocarde, côlon, méninges		
VIII						
IX	62.192			Aponévrose psoas Tumeur unique		
X	62.403 à 407	2.770 à 2.772	2.837 à 2.839	Localisations multiples	+	+
XI	62.408			Localisations aortiques		

Les lacunes dans nos observations viennent du fait que primitivement l'objectif était uniquement un contrôle histologique.

Depuis, un protocole strict a été établi et toute une équipe se déplace aux abattoirs pour une étude systématique :

— Anatomie macroscopique avec film cinématographique et photographie ;

— Microscopie électronique ;

— Culture de tissu ;

— Prélèvement d'un litre de sang pour conserver du sérum d'animal atteint de mélanome et par ailleurs pour établir :

  — le caryotype,

  — les tests immunologiques de lympho et cyto-toxicité,

  — les tests d'immunofluorescence ;

— Enfin et surtout, une masse tumorale importante pour la biochimie.

Voici à titre d'exemple l'une de nos dernières observations :

OBSERVATION DU CHEVAL X (Pl. X, fig. 7 et 8)

1) *Examen clinique :*

Il s'agissait d'une jument grise, mouchetée, âgée de 14 ans, originaire de Yougoslavie, d'un poids de 420 kg, en état d'entretien médiocre.

L'examen clinique avant l'abattage révèle de nombreuses tumeurs noires. Celle que l'on trouve à la base de la queue et autour de la région ano-vulvaire semble être la tumeur primitive.

Des métastases sous-cutanées existent dans la région ventrale, près de la mamelle. Une petite formation tumorale sous-cutanée de 2 cm de diamètre, fixée sur les plans profonds, existe sur le plat de la joue gauche.

Un petit nodule de 2 à 3 cm de diamètre est visible au niveau de la paupière supérieure droite.

Cet animal, qui présentait une claudication, avait un œdème du paturon et du boulet, et une tumeur sur la face interne de la région tarsienne.

2) *Examen nécropsique - Photographie :*

Après l'abattage, l'examen autopsique a montré de volumineuses masses tumorales autour de l'anus et de la partie terminale du rectum pesant 2 kilogrammes.

Il existait des lésions des ganglions de la chaîne mammaire et à la surface de la mamelle avec des traînées lymphangitiques noires.

Les ganglions iliaques et la chaîne lombaire sont envahis.

Au niveau du psoas existe une volumineuse tumeur, plus particulièrement à gauche, pesant plusieurs kilogrammes.

Une tumeur d'un kilogramme occupe l'épiploon gastro-splénique avec une atteinte de la paroi intestinale.

Dans la cage thoracique, le myocarde révèle plusieurs nodules « noirs » réunis par des traînées « noires » au niveau du sillon antérieur du cœur.

Les ovaires, les reins, la rate et le foie, par contre, ne présentent pas d'envahissement, pas plus que dans le poumon.

Une tumeur de 500 g envahissait le muscle pectoral droit et la région sous-scapulaire.

Enfin, sous la langue et dans les ganglions de ce territoire, il y avait d'importantes localisations ainsi que dans la paroi pharyngée.

3) *Les prélèvements histologiques :*

Ils ont été faits au niveau des différentes localisations tumorales et nous verrons par ailleurs leur étude.

Nous avons rapporté cette observation en détail, car les constatations que nous avons faites correspondent à celles des différents auteurs, dans les tumeurs « noires » généralisées.

Bien entendu, pour cette observation X, toute la série des prélèvements que nous avons signalés ci-dessus ont été pratiqués.

CHAPITRE III

Les techniques utilisées

Dans ce chapitre, nous donnerons toutes les techniques qui ont été employées pour les différentes études, en nous efforçant de mettre en évidence les points délicats auxquels nous nous sommes heurtés à maintes reprises.

Il est bien certain que nous verrons surtout les techniques nouvelles utilisées pour passer plus rapidement sur les procédés habituels bien connus de tous les biologistes.

— I —

ANATOMIE PATHOLOGIQUE

A. — Macroscopie - Autopsies :

a) **Les animaux du Laboratoire :**

Tous les animaux morts spontanément ou ceux qui ont été sacrifiés, près de 400 hamsters actuellement, ont fait l'objet d'une étude morphologique complète, tant macroscopique que microscopique.

L'autopsie systématique donne à l'histologiste non seulement la tumeur mais tous les organes : foie, rate, poumon, cœur, rein, thymus, cerveau.

Lorsque les animaux ont été sacrifiés, des prélèvements furent faits pour la microscopie électronique et pour la culture des tissus.

Les constatations macroscopiques ont été notées sur la fiche d'observation qui suit l'animal depuis sa naissance jusqu'à sa mort. Tout le protocole expérimental qu'a subi l'animal y est noté, ainsi que les examens cliniques auxquels il a été soumis régulièrement.

Ces fiches sont par la suite transformées en fiches perforées pour une analyse possible à l'ordinateur.

b) **Les chevaux des Abattoirs :**

Chaque fois que cela a été possible, un pathologiste du Service d'Anatomie pathologique du C.R.A.C.M. s'est rendu aux abattoirs et, avec l'aide du vétérinaire G.-M. DURAND, a fait l'autopsie et observé la nature et le siège des lésions. L'observation X est le type de ces autopsies.

Cela a été possible quand le diagnostic a été fait du vivant du cheval. Mais lorsqu'il s'agit de découverte à l'examen vétérinaire systématique, les prélèvements et les constatations ont été faites par le Service Vétérinaire

B. — Les techniques histologiques :

Nous devons dès l'abord faire quelques constatations pour les techniques histologiques des mélanomes. Ces constatations, du reste, sont valables pour bien d'autres tumeurs et pour les prélèvements histologiques tissulaires et cellulaires en général.

Deux cas distincts se présentent journellement.

Dans le premier, hélas, le plus courant, le prélèvement arrive au pathologiste tout fixé dans le liquide de Bouin, quant au surplus il ne s'agit pas d'un tout petit fragment prélevé sur la pièce entière. On se trouve alors contraint aux techniques histologiques de routine sans pouvoir utiliser les ressources de l'ultrastructure ou de l'histo-enzymologie.

Dans l'autre cas, corollaire du premier, le pathologiste est convoqué pour un examen extemporané, sans précision sur la nature probable de l'examen et en dehors d'un centre hospitalier associé à un service de recherches il est impossible d'utiliser les techniques nécessaires dans le cas particulier.

C'est pour cela que H. BONNEAU, un des pionniers de la biopsie extemporanée par congélation (93-94), nous conseille toujours d'avoir avec nous, en dehors de notre matériel à congélation, un nécessaire pour inclusion en microscopie électronique qui comporte :

— un petit flacon avec un fixateur (Glutaraldéhyde à 5 %) ;

— une carte de bristol ;

— un cure-dent en bois ;

— une lame de rasoir type Gillette.

Avec ce petit nécessaire, on peut immédiatement traiter un prélèvement, le découper et le fixer.

Le fixateur permet un certain temps d'attente avant le traitement au laboratoire de microscopie électronique.

De plus, il est possible d'avoir également un thermos avec du carboglace qui permet de conserver sans fixation un fragment tissulaire sur lequel se feront les techniques spéciales à chaque type de recherche.

Mais si cela est facilement réalisable en milieu hospitalier, c'est assez difficile en pratiques privées, ou alors il faut un pathologiste vraiment amoureux de la recherche histo-pathologique !

On doit noter également que, pour le mélanome, certaines techniques étaient autrefois essentielles pour le diagnostic histologique : coloration de Fontana, dopa-réaction et coloration de Perls. Or, l'utilisation du microscope électronique, lorsqu'elle est possible, rend pratiquement inutile leur utilisation, encore que la dopa-réaction dans certains cas, nous le verrons, reste encore utile.

Par contre, les recherches histo-enzymologiques, avant leur application possible en ultrastructure, restent encore nécessaires et nous verrons leur application possible à l'orientation thérapeutique (β glucuronidase).

Quoi qu'il en soit, nous envisagerons donc les techniques possibles sur les pièces fixées au liquide de Bouin ou au formol salé à 10 % et les techniques à employer pour les mélanomes sur les fragments tissulaires non fixés.

A) PIECES FIXEES

Ce sont les prélèvements faits en salle d'opération sans que le pathologiste soit averti. La fixation est faite au liquide de Bouin et, dans les cas les plus favorables, au formol salé à 10 %.

Au laboratoire d'anatomie pathologique du C.R.A.C.M., tous les prélèvements sont colorés, soit par l'Hématéine-éosine seule, rarement du reste, soit par l'Hématoxyline ferrique érythrosine Safran d'une façon constante.

A ces colorations s'ajoutent, à la demande, toutes les colorations habituelles : Trichrome de Masson, soit au bleu, soit au vert lumière.

Pour les tumeurs mélaniques, toutes les techniques histo-chimiques permettant de caractériser les mélanines, doivent être mises en jeu.

Les procédés utilisés sont évidemment bien différents selon que l'on s'adresse à des tumeurs fortement pigmentées ou à des tumeurs achromiques ou peu riches en pigment apparent.

1. — **Colorations de routine** (95) :

Quelle que soit la technique de routine du laboratoire, dans les tumeurs fortement chromiques, le pigment apparaît en noir intense dans les cellules, opacifiant tellement celles-ci que les détails cytologiques disparaissent (tumeur « noire » du cheval ou du hamster, induite par le D.M.B.A.).

2. — **Coupes sans coloration :**

Lorsque, dans une préparation, on trouve du pigment qui se dissocie mal ou apparaît mal en raison de la coloration même des tissus, il est facile de faire une coupe sans coloration.

Après déparaffinage, passage dans un bain de carbonate de Lithine pour enlever la coloration due à l'acide picrique en cas de fixation au liquide de Bouin, et ensuite sans coloration, montage au Baume du Canada.

Sur les coupes ainsi traitées, le pigment seul va apparaître avec sa teinte naturelle qui peut aller du jaune au noir, en passant par le brun et le violet.

Mais ce procédé ne permet en aucun cas d'affirmer que le pigment est de la mélanine ; d'autres pigments chromolipoïdiques, hémosidériniques et lipofuschiniques, peuvent prendre ces colorations.

Cependant, la certitude de la présence du pigment va orienter les recherches vers la caractérisation de ce pigment.

3. — **Décoloration du pigment :**

A l'opposé de ce que nous venons de voir, il est parfois utile d'éliminer le pigment en excès car il masque les détails cytologiques et empêche de déterminer la nature de la tumeur.

Notons que les mélanines et les chromolipoïdes suffisamment oxydés sont insolubles dans tous les solvants organiques, d'où leur conservation parfaite dans les coupes histologiques. Les mélanines résistent aux acides organiques et minéraux. Elles sont dissoutes par les alcalis concentrés, mais alors les tissus sont eux-mêmes détruits et avec eux les structures histologiques que l'on recherche.

Les mélanines possèdent parmi leurs caractères chimiques la faculté de décoloration par oxydation.

Cette propriété permet, du reste, de faire la distinction entre les mélanines et les lipofuschines ou d'éliminer un pigment trop abondant qui gêne l'étude cytologique.

— *Technique de HUECK (à l'eau oxygénée) :* Nous tirons cette technique du traité de GABES (96) :

— Coupes à la paraffine, déparaffinées, hydratées.
— Colorer 30 minutes par une solution aqueuse saturée de sulfate de bleu de Nil.
— Rincer à l'eau distillée.
— Traiter pendant 12 à 24 heures par l'eau oxygénée à 3-10 % (10 à 30 volumes).
— Laver à l'eau de ville.
— Monter à la glycérine.

Les chromolipoïdes, lipides « acides » sont colorés en bleu, les mélanines sont décolorées par le traitement à l'eau oxygénée.

— LISON (97) et GABES (96) indiquent d'autres méthodes de blanchiment :

— le chlore
— le brome
— le diaphénol
— l'acide performique ou peracétique.

Ces méthodes demandent des manipulations difficiles et parfois dangereuses.

Aussi nous préférerons, avec PEARSE (98), le procédé à l'eau oxygénée soit par la technique de HUECK, soit par la technique modifiée qui utilise : une solution d'eau oxygénée et ammoniaque.

— Enfin, GABES conseille le *permanganate* de potassium, d'utilisation plus facile.

On plonge les lames déparaffinées et hydratées dans une solution aqueuse à 0,25 % de permanganate de potassium. La décoloration est obtenue en moins de 4 heures.

Pour GABES, la décoloration peut être obtenue en quelques minutes en utilisant le mélange préconisé par GOMORI (1941) :

Solution de Mno^4K à 2,5 %	1 volume
SO H^2 à 5 %	1 volume
H^2O distillée	6 à 8 volumes

— Rincer sommairement à l'eau de ville.
— Décolorer par une solution à 3 à 5 % de métabisulfite de sodium ou par une solution à 4 % d'acide oxalique.
— Laver 2 à 5 minutes à l'eau courante.

Il est certain que cette technique est rapide et simple, mais elle modifie notablement certaines affinités tinctoriales. Nous l'utilisons donc pour tester le pigment et non pour une étude tissulaire.

4. — **Coloration de la Mélanine** (95, 96, 97, 98, 99, 100) :

Le pouvoir réducteur est un des caractères primordiaux des mélanines largement utilisé en histo-chimie. Elle est particulièrement utile lorsque le pigment se présente sous forme de grains très fins à peine perceptibles.

La réaction argentaffine, aux complexes alcalins d'argent, est donnée par les mélanines de façon très rapide et très énergique, alors que les lipofuschines ne donnent, suivant leur degré d'oxydation, que des réactions négatives ou très peu positives.

* *Réaction argentaffine classique de MASSON* (1926) :

Elle est bien connue, pas toujours facile à réussir et l'on en trouve la technique détaillée dans tous les traités d'histo-chimie : LISON, GABES, GANTER, PEARSE.

** *La réaction à l'argent-hexaméthylène tétramine (Technique de LILLIE et BURTNER - 1949) :* Plus récente, a l'avantage d'un prix de revient moins cher et d'une plus grande rapidité et le produit peut se conserver longtemps à froid et à l'obscurité.

Préparation de l'argent-hexaméthylène tétramine :

Ajouter à 100 ml d'une solution aqueuse à 3 % d'hexaméthylène tétramine, 5 ml d'une solution de nitrate d'argent à 5 % ; agiter jusqu'à dissolution du précipité. Ce réactif peut être conservé à froid et à l'obscurité plusieurs mois.

Technique de la coloration :

— Coupes déparaffinées, hydratées.
— Traiter pendant 10 minutes par le liquide de Lugol (iodure de potassium 2 g - iode métalloïdique, 1 g - eau, 100 ml).
— Blanchir par une solution aqueuse à 5 % de thiosulfate de sodium.
— Laver 10 minutes à l'eau courante.
— Rincer dans deux bains d'eau distillée.
— Traiter en récipient (tubes BOREL ou cuve à rainures) bien couverclés à l'étuve à 60° par le mélange :
  — solution d'argent-hexaméthylène tétramine, 30 ml.
  — tampon au borate Ph 7,8.
  — solution acide borique à 1,24 %, 16 ml.
  — solution de tetraborate de sodium décahydraté à 1,9 %, 4 ml.
— Le temps d'action optimal est de 30 à 60 minutes, si la solution a été préalablement portée à 60 %, de 3 heures si les coupes y sont placées à la température du laboratoire, puis portées à l'étuve.
— Rincer à l'eau distillée.
— Virer par une solution de chlorure d'or à 0,1 % pendant 5 minutes.
— Rincer à l'eau distillée.
— Traiter par une solution aqueuse à 5 % de thiosulfate (hyposulfite) de sodium pendant une minute.
— Rincer longuement à l'eau de ville (5 minutes).
— Colorer le fond par la Safranine-picro-indigo Carmin.

Les préparations sont optiquement très belles, mais on doit tenir compte de la difficulté qu'il y a à déterminer exactement le temps idéal d'action du complexe à l'argent : une durée insuffisante donnera une erreur par défaut, un temps trop prolongé donnera des phénomènes d'argyrophylie, avec une erreur par excès.

On s'apercevra de cet excès lorsque l'on constatera un noircissement des fibres collagènes.

Enfin il faut noter que la réaction argentaffine si elle révèle les mélanines, donne également des résultats positifs avec les ortho et para-polyphénol, l'acide urique, les urates, les aldéhydes. Elle donne des résultats négatifs avec les thiols.

PLANCHE XI

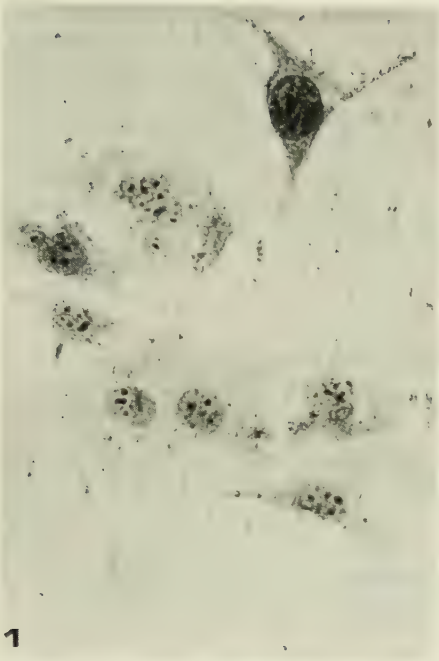
Coloration de la mélanine

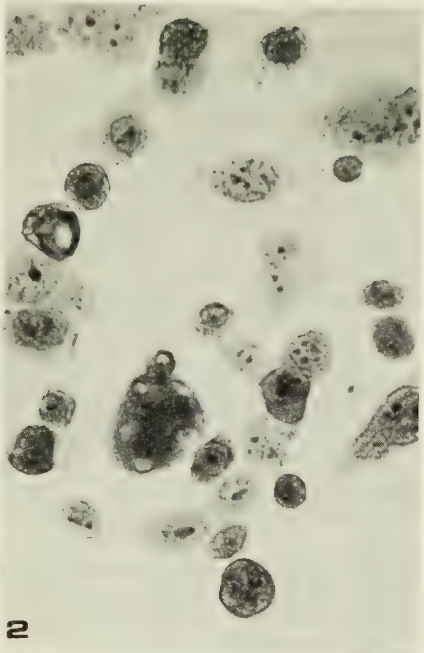
Figure 1 : Culture de la souche MM # 2-87-341 de MOORE. 1er passage : examen 13.538 ; coloration Harris-Schorr témoin.

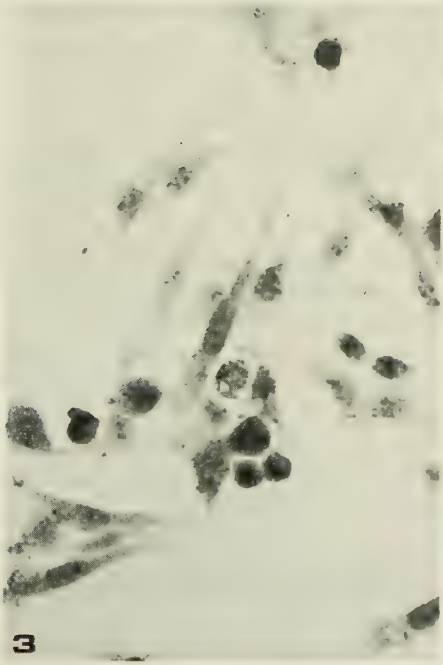
Figure 2 : Culture de la souche MM # 2-87.341 de MOORE. 2e subculture. Coloration de Harris-Schorr témoin.

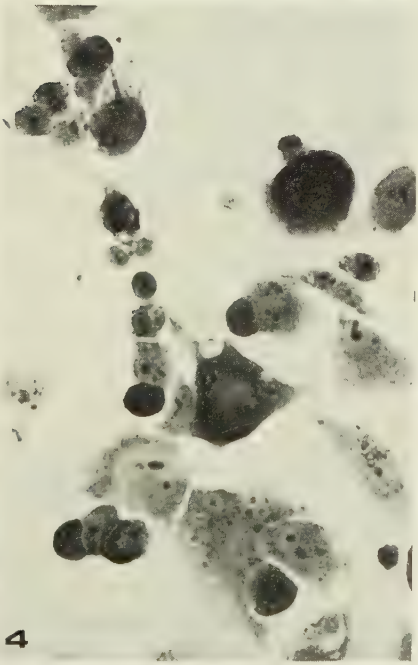
Figure 3 : Coloration classique dite de Fontana ; même culture que la figure 1 témoin ; on distingue quelques rares cellules « argentaffines ».

Figure 4 : Coloration classique dite de Fontana. Même culture que la figure 3 témoin ; on trouve de nombreuses cellules fortement « argentaffines ».


1


2


3


4

**** La réaction à l'argent-hexaméthylène tétramine en milieu acide* (LILLIE - 1965) :

Dans les cas litigieux entre les mélanines et les lipofuschines, LILLIE, en 1965, a conseillé d'utiliser la réduction des sels d'argent en milieu acide. Voici la technique qu'il conseille :

— Coupes déparaffinées, amenées à l'eau.
— Traiter pendant 1 heure **au plus** à 25° C et à l'obscurité par la solution de nitrate d'argent, 1,7 g ; tampon de Walpole (acétate de sodium-acide acétique) Ph 4, 100 ml.
— Laver à l'eau distillée.
— Laver rapidement dans une solution aqueuse à 5 % de thiosulfate de sodium.
— Laver pendant 10 minutes à l'eau courante..
— Colorer le fond, s'il y a lieu (safranine, fuschine borique, laque alumine de rouge nucléaire solide, etc...).
— Déshydrater par l'alcool absolu, éclaircir à un hydrocarbure benzénique, monter au Baume du Canada.

Le noircissement des mélanines cutanées est généralement obtenu en une dizaine de minutes, mais certaines localisations du pigment ne sont révélées qu'en une heure. Le résultat obtenu est une teinte noire intense.

5. — **Les réactions négatives de la mélanine :**

En présence de pigment, sur une coupe histologique, la question peut se poser de le différencier de la mélanine.

Celle-ci ne donne ni les réactions de la tyrosine, ni celles du tryptophame.

L'azo-réaction utilisée pour détecter les composés de l'histidine est négative. La détection des acides nucléiques et des micropolysaccharides (P.A.S.) reste négative.

Dans certains cas de pigment brun ocre, il est capital de faire le diagnostic différentiel avec les pigments hémosidériniques.

Nous ne détaillerons pas les techniques qui sont classiques.

Rappelons simplement que la réaction de PERLS décèle le fer ionique trivalent, le bleu de Turnbull le fer ionique bivalent, la réaction de QUINCKE et celle de TIRRMANN et SCHMELZER le fer ionique total (96).

B) LES PIECES NON FIXEES CONGELEES

Lorsque le pathologiste sait à l'avance qu'un mélanome doit être opéré et *a fortiori* pour les animaux en expérience, en dehors des fragments nécessaires à l'ultrastructure et à l'histologie conventionnelle, tout le reste de la pièce opératoire doit être placé au carboglace pour son utilisation éventuelle. Cette congélation permettra par la suite toutes les études histo-chimiques et histo-enzymologiques.

1. — **La biopsie extemporanée :**

Elle est de pratique courante pour les mélanomes, ce qui n'est pas sans poser parfois des problèmes diagnostiques délicats.

Pour la biopsie extemporanée, nous nous servons de la technique à la congélation en exécutant des coupes sur la cuve de LEROUX, selon le procédé de H. BONNEAU (93), en colorant avec du bleu de Toluidine phéniqué en solution alcoolique à 50 %.

Cette biopsie extemporanée a du reste l'avantage de pouvoir orienter correctement les prélèvements pour la microscopie électronique. Les petits cubes sont faits sur une tranche semblable à celle que l'on a sous le microscope au cours de l'examen extemporané. Cette tranche sera incluse à la paraffine et permettra d'identifier les zones examinées au microscope électronique, celles-ci ayant été numérotées selon un schéma la reproduisant.

Pour la cytologie extemporanée, nous employons sans fixation, immédiatement après l'apposition sur lame, le bleu de Toluidine phéniqué en solution alcoolique (Bleu de SABRAZES).

On verse sur la lame au compte-gouttes la quantité nécessaire à recouvrir l'apposition. On laisse en contact 15 à 20 secondes, on rince à l'eau de ville et on monte directement à l'eau avec une lamelle.

L'examen étant fait, on peut enlever la lamelle, sécher la lame et au laboratoire, après rinçage léger à l'alcool : on monte le frottis au Baume du Canada, ce qui permet sa conservation.

La confirmation histologique et la sanction thérapeutique, souvent très mutilante, qui en découle, d'un mélanome cliniquement malin, est le plus souvent facile.

Par contre, dans la tumeur au début en cours de transformation, dans les stades I et II de CLARCK, le doute peut subsister et il faut multiplier les coupes et surtout avoir des préparations excellentes (ce qui n'est pas toujours facile, le prélèvement étant dans ces stades très réduit).

La cytologie extemporanée peut alors donner un appui certain sur les appositions de la tranche de section que l'on doit toujours faire. Elle peut faire osciller le diagnostic vers la malignité lorsque le pathologiste met en évidence des cellules de caractère franchement néoplasique.

2. — **La mise en évidence des précurseurs de la mélanine : dopa-réaction** (Pl. XII) :

Nous avons vu dans le rappel de la mélanogénèse l'importance capitale de l'étape de la transformation de la tyrosine en dioxyphénylalanine (D.O.P.A.) et l'oxydation de ce dernier composé. Cette étape relève en réalité d'un enzyme, tyrosinase ou dopa-oxydase.

La détection histo-chimique de la dopa-oxydase remonte à BLOCH (1917).

Le principe consiste à mettre en contact des tissus frais avec une solution de dioxyphénylaline. L'enzyme cellulaire, si elle est présente, va déclencher la formation de mélanine sous forme de précipité noir. Actuellement, on utilise deux techniques pour la recherche de la dopa-oxydase : la technique de LAIDLAW et BLACKBERG et la technique de GOMORI.

Elles dérivent du fait que la fixation de courte durée (moins de 7 heures) dans du formol neutralisé et refroidi, ne modifie pas les activités enzymatiques qui nous intéressent. Nous avons eu recours à la technique de GOMORI.

PLANCHE XII

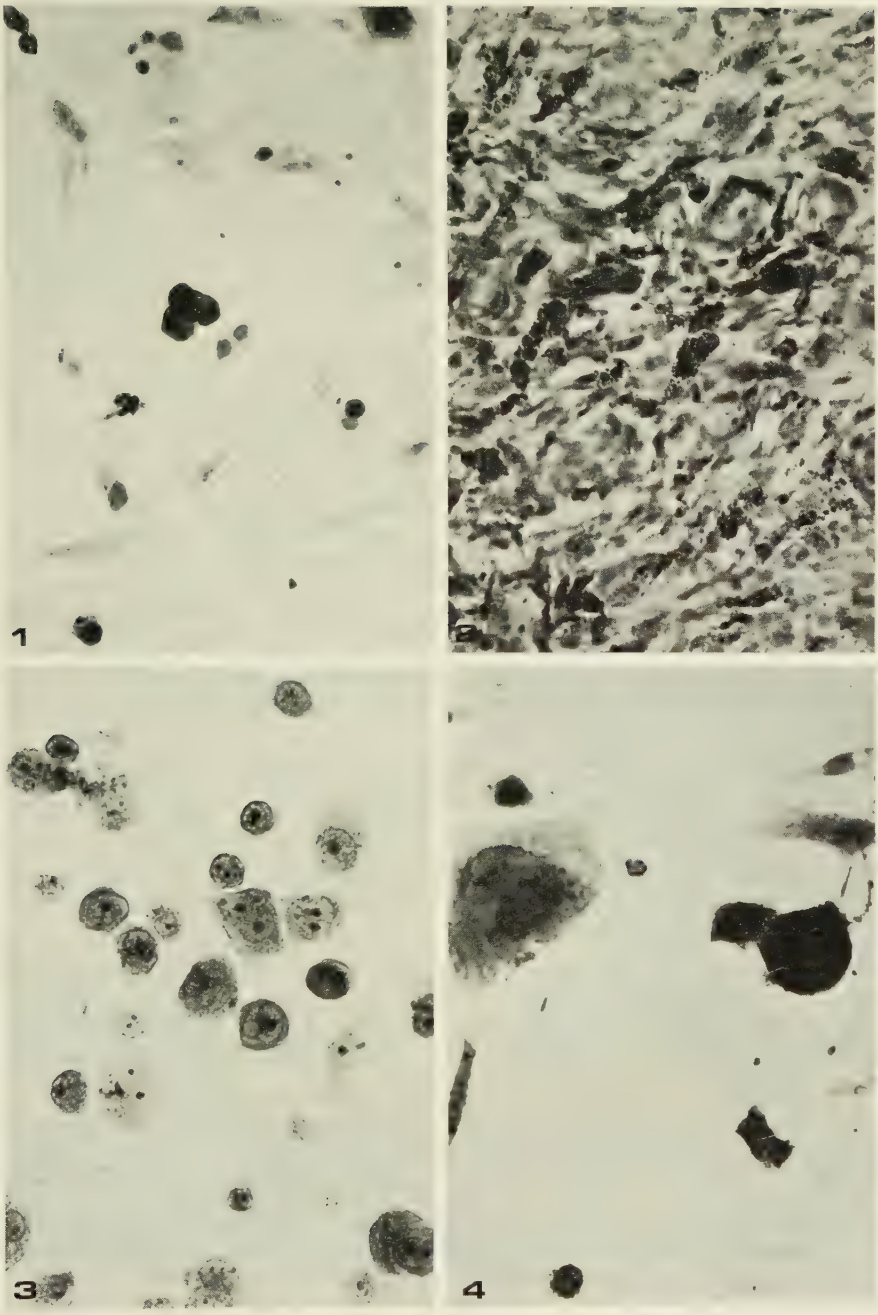
La dopa-réaction

Figure 1 : Au centre, 3 cellules dopa-positives (?). Il s'agissait d'une culture de la tumeur transplantable MOORE du hamster 5.145 (5e passage, 3e série). Examen N° 58.843.

Figure 2 : Coupe témoin d'un mélanome humain.

Figure 3 : Souche MOORE MM # 2-87.341, en culture à son arrivée à Marseille. Examen N° 13.653 (2e subculture).

Figure 4 : Souche MOORE MM # 2-87.341 : dopa-réaction positive (?) sur la 3e série, 4e passage. Examen N° 59.656.


1
2
3
4

* *La technique de GOMORI :*

— Fixer pendant quelques heures par le Formol à 10 % neutralisé et refroidi.

— Débiter au microtome à congélation

— Rincer les coupes rapidement à l'eau distillée et les incuber à 37° C dans le substrat de LAIDLAW et BLACKBERG :

— Tampon de SORENSEN 0,1 M Ph 7,4 : 100 ml.

— Dihydroxyphénylalanine : 0,1 g.

— Changer le bain une ou deux fois si le délai d'incubation dépasse une heure. Eviter d'aller au-delà de 5 heures.

— Laver les coupes à l'eau de ville, pratiquer, le cas échéant, une coloration de fond, coller sur lame déshydratée, éclaircir et monter au Baume du Canada ou une résine synthétique.

Le résultat positif de la réaction se traduit par une teinte allant du gris brun au noir.

Cette réaction sera positive dans les cellules ayant une activité mélanogénétique et permet de situer les sites d'action de la dopa-oxydase.

Elle sera négative dans les cellules ayant utilisé toute leur enzyme, mélanocytes bourrés de pigments terminés. De même, elle est négative dans les mélanophages dépourvus de dopa-oxydase.

Enfin, elle sera négative dans les cellules du tissu mélanogène ayant une délétion enzymatique de tyrosinase ou dopa-oxydase (Albinos).

3. — **Le diagnostic différentiel entre mélanocytes et macrophages :**

Nous verrons par la suite l'importance prise actuellement entre ces deux types de cellules. Il nous est donc apparu nécessaire d'étudier en histochimie cette différenciation quand la microscopie électronique n'avait pu être faite.

Dans certains cas de pigment brun ocre, il est capital de faire le diagnostic différentiel avec le pigment hémosidérinique comme nous l'avons déjà dit, ce pigment étant souvent inclu dans les macrophages.

L'activité phosphatasique des macrophages est intense alors qu'elle est pratiquement nulle dans les mélanocytes, comme l'a montré H. LEJEUNE au récent symposium de Lyon (101).

La technique de détection des phosphatases acides est plus délicate que celle des phosphatases alcalines. Il faut traiter les pièces fraîches immédiatement au microtome à congélation. L'histo-enzymologie présente dans ce cas particulier toutes les suggestions de cette méthode, pleine de promesses pour l'avenir.

Deux procédés sont utilisés, soit la technique de GOMORI au nitrate de plomb, soit en utilisant comme substrat les phosphates de Naphtol (96). Quel que soit le procédé, il y a une nécessité absolue à opérer en pH 5 à 5,2.

LEJEUNE a utilisé la technique de MISHIMA de la double détermination enzymatique de la phosphatase acide et de la tyrosinase (102).

4. — **L'activité enzymatique de β-glucuronidase des mélanocytes :**

E. BOYLAND, dans ses magnifiques travaux sur la carcincgénèse des tumeurs de la vessie par les colorants, avait mis l'accent sur l'importance de la béta-glucuronidase. La présence de cet enzyme étant indispensable à l'apparition des tumeurs dans les cellules de la muqueuse vésicale.

A la suite de ces travaux, furent entreprises des études de l'activité enzymatique, en β glucuronidase, dans les différents cancers du sein et de l'utérus (—), de la protaste (106), de la muqueuse buccale (107), du tissu nerveux (108), du tissu conjonctif (104) et dans l'hépatome expérimental du rat (110).

J. HEWITT, M. GUIGON et coll. (112), à la suite de FISHMANN et MONIS (104), ont entrepris cette étude sur les mélanomes dans le cadre de l'E.O.R.T.C. (Cooperative Group on Melanoma).

Technique de SELIGMAN et collaborateurs :

— *Principe :*

Hydrolyse enzymatique du 6 - bromo - 2 naphtyl β. D - glucopyruronoside avec mise en évidence du 6 - bromo - 2 - naphtol par post couplage au diazo d'o-dianisidine.

— *Technique* (GABES, p. 635) :

Comme toujours en enzymologie, il faut travailler sur des tissus frais, débités au cryostat après fixation rapide de 10 minutes à + 4° C, au Formol neutralisé et refroidi.

On peut également faire la même fixation et faire des coupes au microtome à congélation et laver à l'eau froide 15 minutes.

— Incuber pendant 4 à 6 heures à 37° dans le substrat préparé de la manière suivante :
  — dissoudre 30 mg de 6-bromo 2 naphytyl-beta-D glucopyruronoside dans 5 ml d'alcool méthylique absolu, ajouter 20 ml de tampon de Mc ILVAINE Ph 4,95 et 75 ml d'eau distillée.
— Laver à l'eau distillée (1 minute environ).
— Coupler pendant 2 minutes dans une solution à 0,1 % de sel bleu solide B préparé dans un tampon de SORENSEN, 0,02 M de Ph 7,5 (refroidir avant la dissolution du sel).
— Laver par deux bains d'eau distillée froide (quelques secondes).
— Laver à l'acide acétique à 0,1 % (quelques secondes).
— Monter dans un milieu miscible à l'eau.

— *Résultats :*

Les activités β glucuronidasiques sont signalées par une teinte bleue, les lipides étant colorés en rouge.

C) LES TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

1. — **La cytologie extemporanée :**

Comme nous l'avons dit, nous avons utilisé le bleu de Toluidine phéniqué en solution alcoolique qui a le double avantage de fixer les cellules et de donner une coloration excellente en 30 secondes.

2. — **La cytologie des cellules en culture :**

Pour toutes les cultures, un certain nombre de lamelles en tube de LEIGHTON sont utilisées.

Ces lamelles sont fixées à l'alcool-éther dans le tube lui-même après rejet du milieu de culture et lavage rapide au sérum physiologique pour éliminer l'excédent d'albumine qui gêne souvent les colorations.

Alcool absolu

Ether anesthésique

On peut avec cette fixation faire les belles colorations si bien différenciées de type PAPANICOLAOU ou HARRIS-SCHORR.

On peut également sans fixation à l'alcool-éther faire une coloration à l'hématéïne-éosine ou une coloration de MAY-GRUNDWALD GIEMSA.

Enfin, sur ces lamelles on pourra exécuter, sans avoir recours au cryostat ou au microtome à congélation, les techniques enzymologiques : dopa-réaction, β glucuronidase.

Mais on devra toujours avoir recours à la technique d'examen du contraste de phase en plaçant sur une lame porte-objet avec du milieu de culture les cellules « in vivo ». On pourra ainsi obtenir à tout moment un aspect cytologique des cellules et de leurs modifications (Pl. XXIV).

— II —

ULTRASTRUCTURE

Ainsi que nous l'avons signalé sur les tableaux (I - II - III - IV - V - VI - VII et VIII), de nombreux prélèvements pour l'étude au microscope électronique ont été faits. De même, certaines cultures de tissus ont été prélevées dans le même but.

Deux microscopes électroniques ont été utilisés :

— Le microscope HITASHI H.7.S du département d'ultrastructure du Service de Recherches du C.R.A.C.M. ;

— Le microscope PHILIPS E.N. 300 du département de Pathologie cellulaire et tissulaire de la Faculté de Médecine de Marseille.

A) *La fixation* des prélèvements a été faite dans un milieu à la glutaraldéhyde à 6,25 % suivi de tétra-oxyde d'osmium à 2 % dans le tampon MILLONIG.

B) *L'inclusion* se fait en araldite par la technique de A.-M. GLAUERT et R.-H. GLAUERT (113).

Cependant, en ce qui concerne le mélanome équin pour lequel il y a, avec cette technique, des défaillances, le faisceau électronique faisant éclater les grilles, J.-P. CESARINI nous a conseillé l'utilisation d'Epon 812 mélange dur.

Pour l'enrobage, il faut de très petits fragments, 10 environ pour un mml.

La déshydratation doit être pratiquée avec de l'alcool absolu et on obtient le « blanchiment » avec de l'oxyde de propylène.

Nous avons utilisé également pour les cultures de tissus, soit du G.M.A., soit de l'Araldite.

Pour étudier les cellules des tumeurs mélaniques mises en culture, nous avons suivi la technique que J.-P. CESARINI a mis au point dans le laboratoire et qu'il nous a enseignée.

Dans le flacon même, où s'est effectuée la culture cellulaire, on remplace le milieu de culture par le fixateur à la glutaraldéhyde à 2,5 % et à l'acide osmique à 1 % en tampon cacodylaté à pH 7,5.

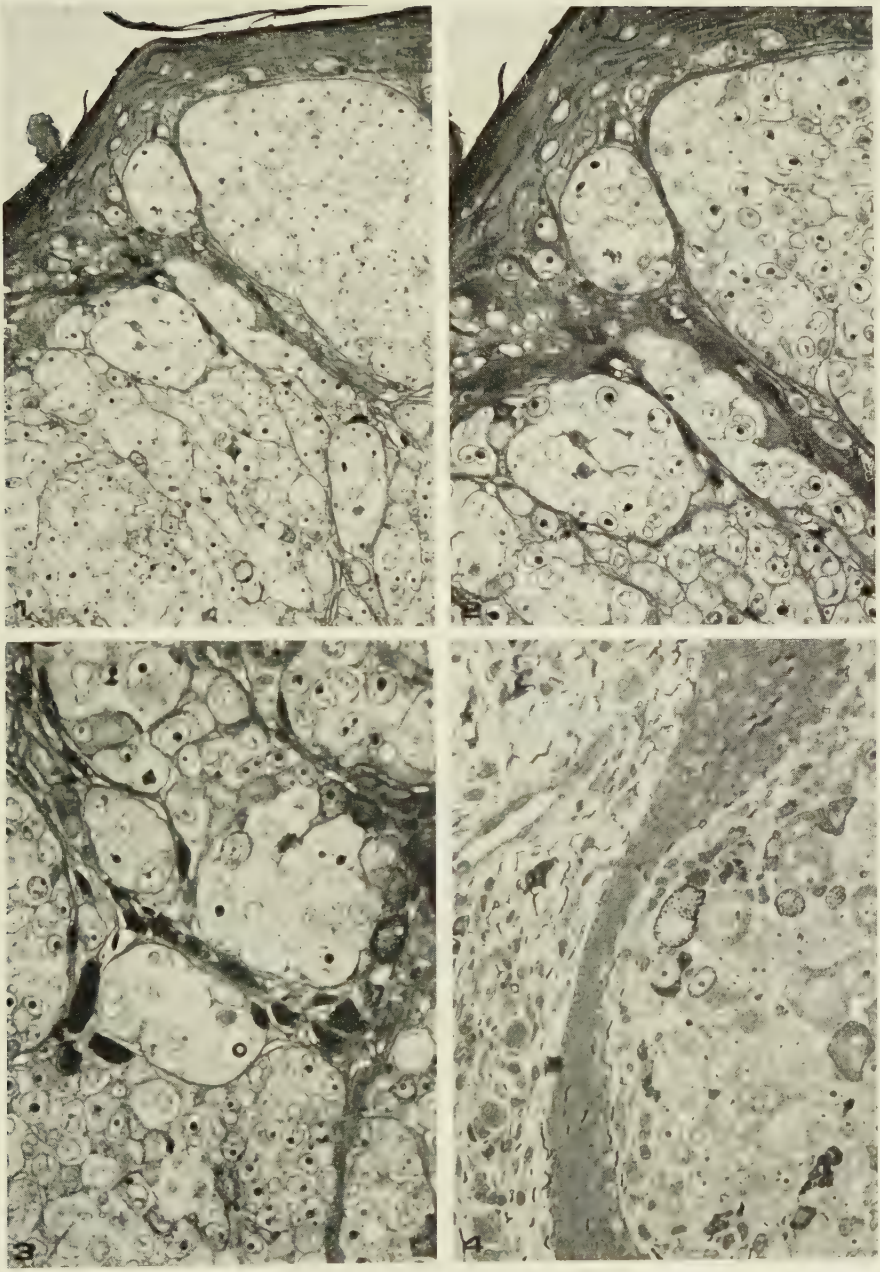
PLANCHE XIII

La technique des coupes semi-fines dans les mélanomes fait apparaître des détails qui ne sont pas perceptibles sur les coupes à la paraffine. Il s'agit d'un mélanome malin nodulaire, humain, confié au Service de microscopie électronique du C.R.A.C.M., par le Pr. BRUN de Genève.

Figure 1 : Aspect général qui fait ressortir le contraste entre les mélanocytes malins très clairs et les kératinocytes.

Figure 2 : La montée des thèques intra-épithéliales.

Figures 3 et 4 : Détails cytologiques faisant apparaître la différence entre les mélanocytes clairs et les mélanophages à « gros grains ».


1
2
3
4

Par la suite, deux moyens sont utilisés après les différents temps de déshydratation pour l'inclusion :

— soit dans le flacon même que l'on brise pour obtenir la plaque d'araldite qui est découpée en bloc ;

— soit par un grattage léger des parois du verre avec un mandrin coudé, recouvert d'un fin tube en caoutchouc. On obtient ainsi par centrifugation un petit bloc qui est traité comme un fragment tissulaire.

Cette technique par centrifugation nous a également permis de faire l'étude ultrastructurale des culots de centrifugation différentielle, obtenus dans le Service de Biochimie.

La pousse sur lamelle de matière plastique n'est pas réalisable dans la culture des mélanomes (114).

C) *Les coupes* furent obtenues sur microtome REICHERT. Pour le mélanome du cheval, il vaut mieux utiliser le diamant de préférence aux couteaux de verre, en raison de la technique d'inclusion utilisée pour ces tumeurs.

— Les coupes semi-fines, toujours faites pour le contrôle, sont colorées au Bleu de Toluidine (Pl. XIII).

— Les coupes fines sont doublement contrastées après séchage par l'acétate d'Uranyle, selon la technique de WATTSON et au citrate de plomb dans la technique de REYNOLDS (115).

D) *Les photographies* ont été obtenues par plan-film Kodalithe R.R. révélés au D. 11.

Pour l'étude des phénomènes de membranes et de la couche externe des mucopolysaccharides qui se trouvent sur les cellules cancéreuses, en culture, comme l'ont montré DEFENDI (116), J.-P. CESARINI (117 et 118), nous avons utilisé les deux méthodes mises au point ces dernières années pour savoir si les cellules des mélanomes présentaient les mêmes phénomènes que les cellules transformées par le virus Polyome.

Les mucopolysaccharides de surface des cellules en culture sont mises en évidence par le rouge de ruthénium (LUFT J.-H.) (119) et A. MARTINEZ-PALOMO et C. BRAILOVSKY (120). Les glycoprotéines sont contrastées électivement sur coupes fines par le mélange acide chromique-phosphotungstique, après inclusion dans le glycol-méthacrylate.

— III —

CULTURE DE TISSUS

La culture des mélanomes, en particulier des mélanomes malins humains, est souvent décevante. En utilisant les techniques habituelles du Service pour les tumeurs animales transplantables, telles les souches S. 724 (5) ou C.T. 54 (121-122), on obtient des sub-cultures, exceptionnellement des souches continues.

Par contre, la culture du mélanome MOORE souche 87.341, qui est une souche continue d'origine animale, nous a permis d'obtenir facilement des cultures des tumeurs de transplantation.

Cependant, il existe dans le monde quelques souches continues de mélanomes humains que nous avons mentionnées plus haut et dont trois d'entre elles sont entretenues dans le Service de Recherches de la C.R.A.C.M.

Nous rappellerons les techniques conventionnelles et nous verrons les modifications à apporter pour les mélanomes humains en particulier.

A) Techniques utilisées pour les tumeurs transplantables de la souche Moore :

Les tumeurs prélevées sur les animaux sont mises dans une boîte de PETRI où on les dissèque soigneusement pour éliminer au maximum la graisse. On découpe la tumeur en petits fragments.

Après avoir ajouté 6 à 7 ml à 0,25 % de trypsine, on dissocie les cellules entre elles par agitation dans un flacon avec des billes de verre.

Les cellules sont alors prélevées à la pipette et l'on arrête l'action de la trypsine. La mise en culture est faite en milieu de EAGLE enrichi avec 10 % de tryptose et 10 % de sérum de veau.

Pour éviter les souillures possibles, on ajoute également 100 unités par ml de milieu de pénicilline et 50 microgr. par ml de milieu de streptomycine.

Un comptage des cellules est pratiqué à l'hématimètre et l'on met dans chaque flacon de culture de 200 ml : 10^7 cellules.

Nous avons donné les tableaux des cultures qui furent faites avec les tumeurs du mélanome MOORE, pour lesquelles nous avons des examens cytologiques. Ces cultures intéressent les 3 séries que nous avons indiquées plus haut (Tableaux VI, VII et VIII).

La plupart de ces cultures ne furent pas poursuivies ; lorsqu'elles étaient florides, elles furent mises en azote liquide, ce qui nous a permis de faire repartir la souche MOORE quand nous l'avons perdue accidentellement.

B) Techniques modifiées pour les mélanomes humains :

Le problème est tout à fait différent lorsqu'il s'agit de mélanomes humains en lignée continue ou de tumeurs que l'on prélève en salle d'opération et que l'on veut cultiver.

a) Lignées continues de mélanomes humains :

1. - *Souches poussant sur verre :* Que ce soit la souche R.P. M.I. 5 966 (JOHNSON) (123) ou la souche H.T. 114, on utilise les mêmes milieux :

M.E.M. + 10 % sérum fœtal de veau

R.P.M.I. 1.640 + 10 % sérum fœtal de veau.

On ajoute les antibiotiques habituels.

La multiplication cellulaire est très rapide en monocouche très dense. Le nombre des cellules ensemencées est multiplié par 12 en 10 jours.

2. - *Souche poussant en suspension :* La souche S.K. Mel 1 ou SALTMAN, en provenance de Sloan Kettering, obtenue par OETTGEN et ses collaborateurs (124), a été entretenue en Europe par différents milieux de culture, selon les laboratoires et les travaux entrepris.

Ces milieux à base de M.E.M. de sérum de veau fœtal et de R.P. M.I. 1.640 sont plus ou moins privés de tyrosine.

C'est ainsi que le milieu M.E.M. contient 36,2 mg/l de tyrosine, alors que le milieu R.P. M.I. 164 n'en contient que 20 mg/l.

b) Mise en culture des mélanomes humains prélevés en salle d'opération :

1. - *Tumeurs malignes :*

Pour les mélanomes malins, J.-P. CESARINI nous a transmis la méthode utilisée par CLARK à Philadelphie. On se sert des milieux habituels :

— M.E.M. EAGLE + 10 % de sérum de veau.

Mais il faut avant tout éviter les trypsines. On devra donc essayer de dissocier les cellules mécaniquement et de faire des explants.

2. - *Tumeurs bénignes :*

Ces cultures sont aléatoires et difficiles, en particulier dans les tumeurs très fortement pigmentées. Elles seraient particulièrement utiles à mettre au point, pour le mélanome chimio-induit par le D.M.B.A. et pour la « mélanose » du cheval et les mélanoses humaines.

Il faut des milieux extrêmement riches, tel que le milieu de MAC COY auquel on ajoute 30 % de sérum embryonnaire de veau et 20 % de sérum de cheval inactivé à 56° (CESARINI J.-P., non publié).

Là encore, il faut éviter à tout prix la trypsination.

D) **Technique pour la culture des mélanocytes :**

Il est certain que l'idéal pour une étude systématique serait de pouvoir cultiver des mélanocytes à l'état pur. Mais cette culture s'avère actuellement impossible.

La physiologie du mélanocyte est telle que la synthèse normale de la mélanine ne se fait qu'en contact avec les kératinochytes.

Ainsi, les tentatives actuelles se font dans une association des deux souches cellulaires. On cherche d'abord à obtenir un tapis continu de cellules épidermiques et l'on place au-dessus des mélanocytes. On distingue les deux types de cellules par la suite, les unes ayant une synthèse de mélanine, les autres en étant dépourvues.

Ces techniques extrêmement délicates (microdissection pour obtenir des mélanocytes) n'ont pas encore pu être mises au point dans le Laboratoire du C.R.A.C.M. Par contre, J.-P. CESARINI, à la Temple University de Philadelphie, dans le laboratoire de CLARK, travaille cette technique, ainsi que PRUNIERAS à la Fondation Rothschild à Paris.

— IV —

CYTOGENETIQUE

Avec l'aide de la section de Cytogénétique, nous avons pu avoir pour les tumeurs transplantables de MOORE une étude caryologique.

De même, les cellules en culture de la souche MOORE 87.341 ont pu être testées.

La technique utilisée est la méthode habituelle du Service (125).

La culture est faite en milieu de EAGLE enrichi en acides aminés. Après un laps de temps, qui varie entre 2 et 8 jours, le blocage des mitoses se fait avec de la colchicine en solution à 1 %.

Le choc hypotonique est pratiqué par du sérum de veau aqueux et l'éclatement des cellules par projection sur les lames porte-objet.

La coloration est faite selon le procédé classique de GIEMSA.

— V —

BIOCHIMIE

Le département de Biochimie du Service de Recherches du C.R.A.C.M. s'est attelé, depuis sa création, à l'étude biochimique de la protéine de soutien du mélanosome et à la constitution de celui-ci. Les techniques que nous décrivons ont été testées et mises au point par J.-P. KLEISBAUER (126) et pour l'immuno-chimie par G. MEYER et POIRIER (127). Dans ce travail, à prédominance anatomo-pathologique, il nous a paru utile de faire mention de l'ensemble des travaux d'une équipe de chercheurs sur le même sujet : la biologie générale des mélanomes.

Dans le mélanocyte normal, la mélanogénèse aboutit normalement à la production de la mélanine.

Grâce au microscope électronique, on peut suivre les étapes de cette mélanogénèse.

Dans les stades préliminaires, trois éléments sont en présence :

— une matière protéique

— une enzyme : la tyrosinase

— un pigment : la mélanine.

C'est l'étude de ces constituants qui a été faite ou plutôt qui est en cours et qui tend à trouver les différences existant entre le mélanocyte normal et le mélanocyte transformé.

Le matériel utilisé a été détaillé :

— mélanome expérimental du hamster dérivé de la souche MOORE 87.341 ;

— mélanome chimio-induit par le D.M.B.A. ;

— mélanome du cheval ;

— l'homme enfin, quand cela est possible.

A) Etude biochimique des tyrosinases et des protéines solubles :

POMERANTZ (128) ayant étudié les mélanomes chromiques du hamster, J.-P. KLEISBAUER a repris la même étude sur notre souche de mélanome achromique du hamster et chez le cheval.

a) Préparation des extraits tumoraux :

Les tumeurs sont finement coupées à l'aide de ciseaux, lavées par du chlorure de sodium à 9 g %, puis homogénéisées dans la même solution à l'aide d'un ultraturax (24.000 t/mn). Le rapport du poids de la tumeur à la solution de chlorure de sodium est de 1 pour 3.

— L'homogénat est centrifugé une première fois à 3.000 g 30 minutes, puis à 9.750 g 30 minutes à + 4° C.

— Le précipité est fixé à l'osmium et analysé en microscopie électronique.

— Le surnageant est utilisé pour la suite des opérations.

— On doit noter que pour certaines expériences, des culots pour la microscopie électronique ont été obtenus à des vitesses différentes 1.000, 3.000, 5.000, 9.000, 11.000 et 15.000 g.

— Enfin, des variantes de cette technique ont été employées en remplaçant le chlorure de sodium par du chlorure de potassium, de sucrose, de mannitol.

b) **Préparation des protéines solubles :**

1. - *La préparation* a été faite par relargage par le sulfate d'ammonium à 30, 40, 50 et 70 % de saturation.

Après centrifugation à 5.000 g 30 minutes, les précipités sont repris par du bicarbonate d'ammonium 0,1 M., dialysés et lyophilisés.

2. - *La purification* des protéines se fait en deux stades. Dans un premier temps, elle se fait par filtration sur colonne de Sephadex G 100 avec pour l'élution soit un tampon de bicarbonate d'ammonium 0,2 M., soit du trisglycine 0,002 M. pH 8,4.

Dans un deuxième temps, par chromatographie sur échangeur d'ion DEAE Sephadex avec un gradient continu en tampon phosphate (phosphate 0,1 M. pH 6,8), de 0 à 0,3 M. chlorure de sodium.

3. - *Les critères de pureté* se jugent par l'électrophorèse en gel de polyacrylamide à l'aide d'un appareil « quickfitt », en utilisant un gel à 7,5 % en acrylamide et un tampon tris glycine 0,43 M. pH 8,4 et par l'électrophorèse en gel de polyacrylamide à 3,5 % en acrylamide en présence de sodium dodecyl sulfate (S.D.S.).

c) **Caractérisation enzymatique et protéique :**

Pour la tyrosinase, la teneur en protéines dans les différents effluents est directement mesurée par spectrophotométrie à 280 m μ. L'activité enzymatique est mesurée par l'oxydation de la Dopa et l'absorption à 475 m μ qui est le pic d'absorption de la dopachrome (121).

La phénylène diamine est utilisée comme substrat des céruloplasmines et permet la caractérisation directe de celles-ci sur gel de polyacrylamide.

La D.L. Dopa, selon la technique de BURNETT (1969) (129-130), permet de caractériser la tyrosinase sur gel de polyacrylamide. Le Bleu de Coomassie caractérise les protéines.

La phényl-glucuronide est utilisée pour caractériser la béta-glucuronidase.

d) **Caractérisation des métaux :**

La recherche du cuivre et du fer se fait par les méthodes courantes de cuprémie et de sidérémie, à l'aide des produits BOEHRINGER.

B) **Etude immuno-chimique des tyrosinases et des protéines solubles** (141) :

Les différentes protéines obtenues précédemment pour l'étude biochimique ont également été utilisées pour une étude immuno-chimique (131).

Les protéines obtenues par précipitation à 40 et 50 % de saturation en sulfate d'ammonium sont injectées selon les modalités suivantes :

— Le premier mois, les lapins choisis ont reçu dans le coussinet plantaire des quantités croissantes de solution antigénique (0,5, 1, 3 et 4 mg) en émulsion dans de l'adjuvant de FREUND complet, à raison d'une injection par semaine.

— Le deuxième mois, les animaux sont laissés au repos.

— Le troisième mois, les lapins ont reçu 4 mg de protéines avec adjuvant de FREUND complet en alternance dans la région scapulaire et dans le coussinet plantaire des pattes postérieures.

— Après le premier prélèvement de sang pour le contrôle en boîte d'OUCHTERLONY, les lapins ont été saignés dix jours après la dernière injection.

Trois techniques de précipitation en gélose ont été employées :

— L'immuno-diffusion selon la technique d'OUCHTERLONY ;

— L'immuno-électrophorèse sur lame de gélose ;

— Une méthode dérivée de celle d'OUCHTERLONY en utilisant les protéines obtenues sur gel de poly-acrylamide par migration. Les protéines sont séparées par découpage en disques et ceux-ci sont appliqués directement sur la gélose.

— VI —

LES ISOTOPES RADIOACTIFS

Au cours des expérimentations sur la souche MOORE 87.341 à plusieurs reprises, un certain doute sur la nature exacte de la tumeur s'est produit. L'un des passages, le deuxième, s'est même modifié profondément et G. MEYER (132) a pu montrer par les études immunologiques, une surtransformation.

Aussi, nous avons cherché un test complémentaire, assez spécifique pour confirmer ou infirmer la nature mélanique des tumeurs de nos hamsters.

Les contacts entre le Service de Recherches du C.R.A.C.M. et l'U. 53 de l'I.N.S.E.R.M. de Bordeaux, dirigé par P. BLANQUET, sur les « *applications médicales et biologiques des isotopes radioactifs* », par l'intermédiaire de NOUR SAFI, ont permis d'entreprendre cette étude.

N. SAFI (133-139), sous la direction de P. PLANQUET et avec ses collaborateurs (134 à 140), a mis au point une technique de marquage des mélanomes malins par procédé isotopique.

Après avoir utilisé la Diodofluorescéine, marquée à l'Iode 131, qui s'est révélée très valable mais qui était insuffisante pour faire la différence entre un mélanome et une tumeur richement vascularisée, il a obtenu un autre isotope plus précis, l'Iodoquine I. 131. Celui-ci est un dérivé de la Chloroquine, antipaludéen, qui a la propriété de teinter les téguments.

L'Iodoquine s'obtient en effectuant un échange chlore-iode 131 sur le chlore de la chloro-4-quinoléine (Chloroquine).

Nous avons donc envoyé à Bordeaux nos animaux vivants, porteurs de tumeurs transplantables de la souche MOORE 3e série et, à titre de témoins, des hamsters porteurs de tumeurs sarcomateuses induites par le virus Polyome.

Les tumeurs étaient de même taille et les animaux avaient le même âge.

Dans le laboratoire de l'I. N. S. E. R. M. à Bordeaux, N. SAFI leur a administré :

— 30 µ ci Iodoquine 125 I

— 30 µ ci Iodoquine 131 I

après blocage de leur thyroïde, par voie orale (20 gouttes de Lugol).

La scintigraphie a été exécutée par l'appareillage de l'Unité de Recherche de l'I.N.S.E.R.M. de Bordeaux, une caméra à scintillation couplée à un bloc mémoire et une unité de visualisation.

Les examens ont été pratiqués 48 heures, 72 heures jusqu'au 8e jour après l'injection sous-cutanée du produit.

Par la suite, les animaux nous ont été renvoyés pour pouvoir contrôler la nature histologique et ultrastructurale des tumeurs et essayer de déceler la localisation du produit dans les cellules.

— VII —

IMMUNOLOGIE

(143 à 164)

Tous les protocoles entrepris, sur les mélanomes expérimentaux, dans le service du C.R.A.C.M., ont pris une orientation immunologique, après avoir été uniquement histologiques et ultrastructuraux. Ils ont tous pour but final l'essai de mise au point d'une thérapeutique cherchant soit à réveiller les défenses immunologiques déficientes, soit à les provoquer.

Bien que ce travail ait surtout pour objectif les données de la pathologie, il nous a semblé utile d'exposer les apports du département d'immunologie dirigé par G. MEYER, à la biologie générale du mélanome.

Voici quelles sont les réactions qui ont été mises au point et qui permettent de tester : les antigènes cytoplasmiques, les antigènes de membrane, la cyto-toxicité.

Toutes ces réactions sont le résultat des travaux de I. HELLSTROM (162), NAIRN (145), KLEIN (143), NGU (146), MORTON (147), LEWIS (153 à 156), RUMKE (154), G. MEYER (157-161), NAGEL (158-164), CARRAZ (160), DATTA et VANDEPUTTE (163).

Certaines de ces techniques sont de mise au point extrêmement récentes. La réunion de travail de l'E.O.R.T.C., Groupe Mélanome, section Immunologie, s'est réunie à Marseille les 6 et 7 septembre 1971 (comme nous l'avons déjà mentionné), pour unifier les techniques de mise en évidence des antigènes de membrane en immunofluorescence. Mais elles ne peuvent être rapportées dans ce mémoire, étant encore sous « copyright ».

A) MISE EN EVIDENCE DES ANTIGENES CYTOPLASMIQUES EN IMMUNOFLUORESCENCE :

L'antigène cytoplasmique a été décrit pour la première fois par LEWIS (153 à 156).

Ces antigènes sont mis en évidence sur cellules fixées par réaction de COONS indirect en immunofluorescence.

La cellule antigénique est extrêmement fragile et doit être protégée par une congélation très rapide et une fixation à froid. Pratiquement, qu'il s'agisse d'un fragment biopsique ou de cellules en culture, le matériel est plongé rapidement dans un bain d'iso-penthanol, rendu pâteux par l'adjonction d'azote liquide. Dans ces conditions, la température du mélange est aux environs

de —140°. Quand ce mélange redevient liquide, la fixation est terminée et la lame est rapidement séchée à l'étuve à 37° et conservée telle quelle (si ce n'est pas pour l'utilisation immédiate, à —60°).

La source d'anticorps est constituée par les animaux porteurs de tumeurs, et en particulier par des animaux ayant porté des tumeurs, tumorectomisées, et réinoculées par des cellules irradiées.

L'antigène se présente sous forme de mottes cytoplasmiques localisées, respectant le noyau, mais semblant, par moment, avoir des connections avec la membrane cellulaire externe. Nous discuterons la signification de cet antigène cytoplasmique dans le chapitre Résultats (Pl. XXX).

B) MISE EN EVIDENCE DES ANTIGENES DE SURFACE CELLULAIRE :

La première démonstration d'une antigénicité spéciale de la membrane de la cellule mélanique a été faite dans le système humain par l'équipe de M. LEWIS.

Cet antigène de membrane a pu être mis en évidence par la technique d'immunofluorescence et de cyto-toxicité.

a) **Immunofluorescence :**

L'immunofluorescence de membrane ne peut se faire que sur cellules vivantes. Dans notre laboratoire d'accueil, la technique d'immunofluorescence de membrane a été mise au point dans le système virus Polyome-Hamster (161).

La suspension cellulaire, à partir de matériel tumoral, peut être obtenue plus aisément par grattage que par trypsination, même légère, qui risque d'apporter des facteurs aspécifiques. Le point délicat de la technique, dans ces réactions cellulaires en méthode de COONS indirect, est l'absorption correcte du conjugué fluorescent anti-humain.

Les méthodes utilisées dans le laboratoire sont légèrement différentes de celles utilisées par les premiers auteurs : NAIRN et LEWIS (153), qui en ont décrit l'application aux mélanomes.

Effectivement, et pour éviter toute réaction contre des anticorps de transplantation qui ne seraient pas tumoraux spécifiques, nous absorbons les anti-sérums, ainsi que les conjugués sur les lymphocytes porteurs de tumeurs à la dose de 10^7 cellules par ml d'immun-sérum.

L'antigène dans ces conditions, après filtration efficace du rayonnement ultra-violet, par un B.G. 12 de 5 mm et un B.G. 38 de 3 mm, se présente comme une couronne de perles, entourant la cellule.

b) **Les tests de cytotoxicité :**

Les antigènes intra-cellulaires et les antigènes de membrane du mélanome sont capables de stimuler les défenses spécifiques de l'hôte. Ces réactions se manifestent sous forme de supports humoraux ou de supports cellulaires.

Les tests que l'on va employer pour connaître le potentiel de défense contre les cellules mélaniques malignes, vont donc s'adresser soit aux propriétés du sérum du malade, soit aux propriétés des cellules lymphoïdes immunisées compétentes.

1. - Les réactions à médiation sérique : cytotoxicité sérique :

* *Le test d'inhibition des colonies de HELLSTROM I. (162) :*

Sur les primo-cultures en boîte de Pétri, de cellules tumorales, on fait agir du sérum de malade porteur de mélanome, avec du complément. Par rapport aux boîtes témoin, si le sérum contient des anticorps, on note une diminution appréciable des colonies.

* *Le test de cytoxicité à médiation sérique DELLA PORTA-FOSSATI* (202-203) :

Dans le laboratoire, on utilise les boîtes de TERASAKI, qui permettent une réponse plus rapide. On place dans les capsules, 3 à 1.000 cellules tumorales en suspension. On ajoute le sérum testé et le complément dans un volume de 0,02.

Le complément est du sérum de lapin dilué au demi avec du sérum humain du cordon ombilical.

Les résultats ne sont valables que si la diminution des cellules viables est au moins de 60 % et si la variabilité entre les différentes cupules d'une même série permet de conserver, par le test de STUDENT, une signification d'au moins 0,05.

2. - Les réactions à médiation cellulaire : test de lymphotoxicité :

* *Test au Diacétate de Fluorescéine (D.A.F.) de NAGEL* (158) :

Il s'agit d'un test de cytotoxicité « simple, rapide et efficace ».

Les cellules tumorales se laissent facilement marquer par le D.A.F. Une fois pénétrée dans la cellule, la fluorescéine est libérée et fixée activement par la cellule vivante.

Si la membrane cellulaire est détruite, la fluorescéine est relâchée hors de la cellule.

Cette destruction se réalise lorsque l'on met en contact de ces cellules, des lymphocytes immunisés compétents, contre le mélanome, témoignant de la présence d'anticorps.

* *Test de lymphotoxicité : technique de DATTA et VANDEPUTTE* (163) :

Cette technique a été communiquée au service d'immunologie bien avant sa publication. Elle utilise les boîtes de TERASAKI.

On place dans les cupules 100 cellules tumorales en suspension. 24 heures après, on ajoute les lymphocytes immuns dans une proportion qui varie de 200 à 1.000.

A titre de contrôle, on met dans les mêmes conditions une rangée de cupules, les cellules tumorales avec des lymphocytes d'un sujet n'étant pas atteint de mélanome. Une rangée contient uniquement les cellules tumorales sans adjonction de lymphocytes.

Quarante-huit heures après la mise en contact avec les lymphocytes, on lave les plaquettes, on pratique une coloration au Giemsa et l'on compte les cellules.

Si les lymphocytes sont immunisés et compétents, il y aura dans la réaction une destruction de cellules tumorales.

La signification des résultats, comme toujours, est calculée par le test de STUDENT.

* *Test de culture mixte de lymphocytes (M.L.T.C.) NAGEL et coll.* (164) :

Ce test est basé sur le principe de la culture de lymphocytes comme test d'histo-compatibilité.

Les petits lymphocytes en culture, sous l'influence de stimulants (phytohémaglutinine P.H.A.) ou antigènes spécifiques, se transforment en élément de type lymphoblastique.

Dans le cas qui nous intéresse, NAGEL met en culture des lymphocytes supposés sensibilisés contre les antigènes tumoraux du mélanome avec des concentrations diverses de cellules tumorales.

Si les lymphocytes subissent une transformation lymphoblastique, c'est le témoignage d'une stimulation par les antigènes tumoraux des cellules.

La technique en est relativement simple. On fait un mélange en proportion variable de lymphocytes et de cellules tumorales, allant dans la plupart des cas de 1 lymphocyte pour 50 cellules tumorales à 50 lymphocytes pour une cellule tumorale. On incube pendant 3 jours en milieu 199, en présence de sérum humain A.B., ou à la rigueur de sérum de veau embryonnaire à 10 %.

Au bout de 72 heures, on mesure, soit par l'incorporation de thymidine tritiée, soit par l'examen morphologique, la proportion de cellules blastiques.

TROISIEME PARTIE

Etude analytique des données morphologiques et biologiques

Connaissant bien tous les éléments expérimentaux qui ont été utilisés, ainsi que leurs moyens d'études, nous analyserons dans cette troisième partie les données morphologiques et biologiques recueillies.

Ces résultats nous permettront ensuite de faire la synthèse de ce travail.

CHAPITRE I

Les données morphologiques

Les données de la morphologie seront celles de l'anatomie pathologique, de la cytologie et de l'ultrastructure.

Nous étudierons successivement :

— Les tumeurs spontanées du hamster « FORTNER-MOORE » ;

— Les tumeurs chimio-induites par le D.M.B.A. ;

— Les tumeurs mélaniques du cheval.

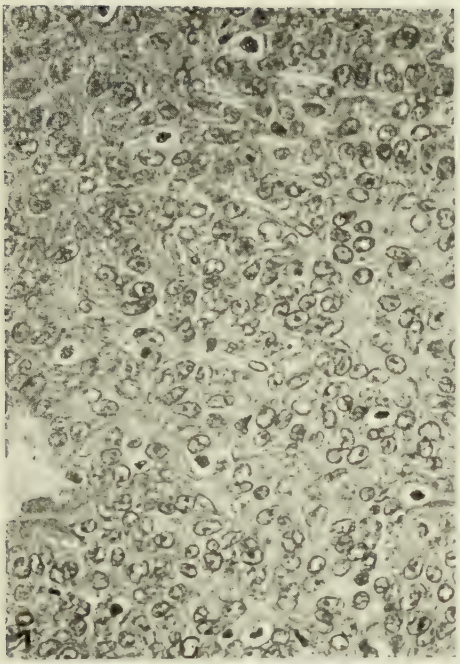
PLANCHE XIV

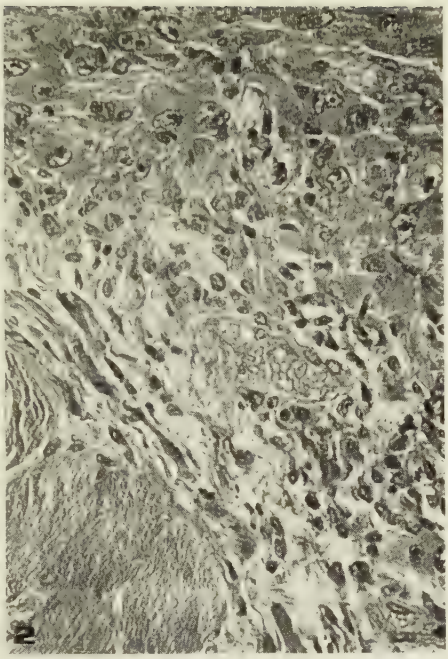
Aspect histologique du mélanome spontané transplantable « FORTNER-MOORE » 1re série.

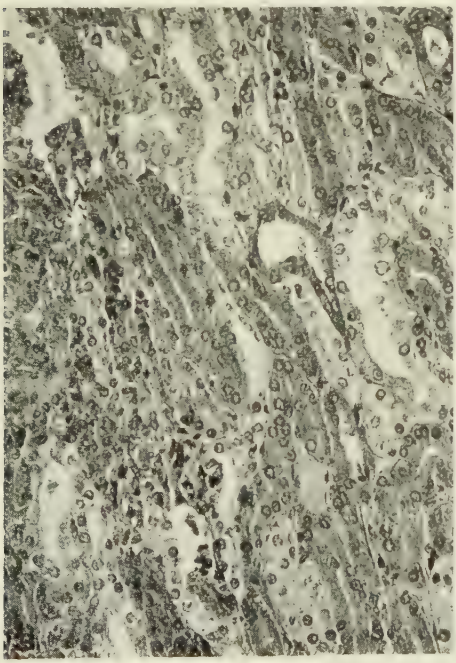
Figure 1 : Hamster 3.863 - Coupe 45.177 - C.R.A.C.M. Mélanome indifférencié achromique très prolifératif, à stroma très pauvre (1er passage).

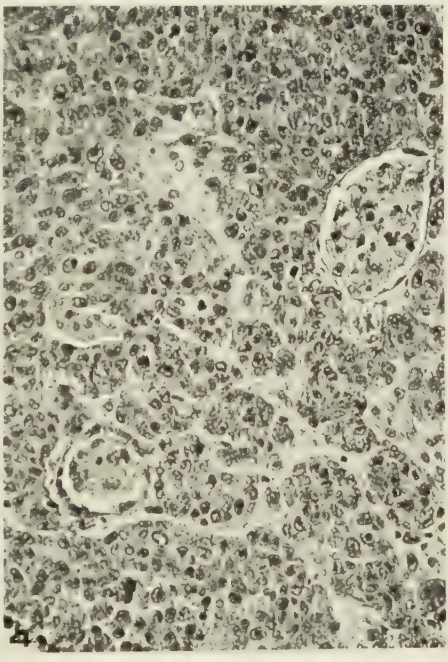
Figure 2 : Hamster 3.863 - Coupe 45.173 - C.R.A.C.M. Les infiltrations musculaires de voisinage.

Figure 3 : Hamster 4.047 - Coupe 48.388 - C.R.A.C.M. Métastases rénales par le mélanome achromique spontané transplantable « FORTNER-MOORE ». Infiltration interstitielle tubulaire (7e passage de la 2e série).









— I —

LE MELANOME SPONTANE DU HAMSTER " FORTNER-MOORE "

Nous avons donné l'origine de nos tumeurs et nous avons vu que, par suite d'un accident, la première lignée tumorale a été perdue après la 14me transplantation. Une deuxième série s'est révélée comme une tumeur inattendue, ce qui a amené la mise en route d'une troisième série.

Envisageons donc ces trois séries. Cette étude porte sur plus de 200 tumeurs qui ont été prélevées soit par autopsie, soit par tumorectomie.

A) Mélanome " Fortner-Moore " 1re série :

Cinquante-neuf animaux ont été examinés entre le 26 novembre 1968 et le 26 janvier 1970. Les tumeurs se sont développées rapidement après l'inoculation des cellules tumorales.

Au bout de 3 semaines à 1 mois, les tumeurs atteignaient le volume d'une noisette à une cerise. Les transplantations d'animal à animal se sont faites régulièrement tous les mois (cf. Tableau de la 1re série).

a) **Etude macroscopique :**

1) *L'aspect clinique* de la tumeur est celui d'une masse arrondie (Pl. X - 5), soulevant la peau de la région dorsale (les inoculations se font à ce niveau). Si on laisse évoluer les tumeurs, elles arrivent à atteindre un volume considérable, parfois le double de la tête de l'animal Elles aboutissent alors à l'ulcération, ce qui provoque, lorsque les animaux sont plusieurs dans la même cage, des phénomènes de cannibalisme.

2) *A l'intervention :* lorsqu'on ne pratique qu'une tumorectomie, après avoir rasé les poils de la bête, on voit les téguments soulevés par une masse arrondie, souvent adhérente aux plans superficiels, constamment aux plans profonds. L'inspection soignée ne met en évidence aucune pigmentation particulière, la peau est rosée (ce qui est nettement différent de ce que l'on verra pour les tumeurs induites par le D.M.B.A.) (Planche X - 5).

L'incision de la peau révèle l'infiltration de celle-ci par le processus néoplasique qui est plus ou moins bosselé, arrondi. Cette masse tumorale est très friable, très hémorragique, rouge-violet foncé. Chez nos premiers animaux H. 3.762, H. 3.860, on pouvait voir quelques très rares traînées d'apparence pigmentée, mais qui pouvaient appartenir à l'hémosidérine.

L'excision totale était toujours difficile, surtout au niveau des muscles de la région dorsale qui étaient toujours infiltrés.

Dans les premiers passages, les tumeurs déposées sur du papier Joseph, laissaient une auréole noirâtre qui suggérait le pigment mélanique. Au fur et à mesure des passages, ce signe a disparu.

A la coupe, la tumeur est très friable, s'écrasant sous le couteau. On y trouve des zones blanchâtres ou grisâtres, qui sont des foyers de nécrose. Dans les tumeurs les plus volumineuses, cette nécrose occupe toute la partie centrale du processus.

3) *A l'autopsie* qui a été faite systématiquement pour tous les animaux morts ou sacrifiés, l'étude macroscopique met en évidence des phénomènes congestifs importants au niveau de la rate qui est souvent augmentée de volume.

— Le foie est également augmenté, surtout en cas de métastases ; celles-ci, suivant le stade évolutif, sont nodulaires ou massives, rouge - violet foncé. Un lobe entier peut être envahi.

— Le rein présente des envahissements nodulaires périphériques, soulevant la corticale.

— Au niveau du médiastin, les envahissements métastatiques sont fréquents, ils débutent par le péricarde pour gagner ensuite le muscle cardiaque.

— Par contre, les envahissements ganglionnaires sont plus rares. Nous avons trouvé quelques ganglions métastatiques, mais ce sont surtout les ganglions médiastinaux, au contact du cœur, qui sont atteints.

— Le poumon est certainement l'organe le plus souvent atteint. Macroscopiquement, on aperçoit un fin piqueté blanchâtre ou rougeâtre sur la plèvre. A la coupe, dans les formes évoluées, on trouve des masses volumineuses, souvent nécrotiques qui atteignent tout un lobe.

— Sur une centaine d'animaux, on a recherché systématiquement la métastase cérébrale, si fréquente chez l'homme. Jamais nous n'avons mis en évidence de localisations secondaires au niveau de l'encéphale ou du canal rachidien.

b) **Etude histologique :**

L'examen des 76 autopsies de la première série du mélanome « FORTNER-MOORE » 87.341 nous a permis de constater que cette tumeur transplantable était particulièrement constante dans ses aspects tumoraux et qu'il n'y avait pratiquement pas de diversité d'un animal à un autre. C'est la raison pour laquelle nous donnons une étude générale de nos tumeurs.

1) *LA TUMEUR TRANSPLANTEE :*

— *L'aspect général* de la tumeur est très monomorphe (Pl. XIV, fig. 1). La prolifération cellulaire forme une nappe uniforme. Cependant, on note très souvent une disposition périthéliale des éléments cellulaires. Dans les tumeurs récentes, aucune zone nécrotique ou dégénérative n'est perceptible, alors que dans les tumeurs évoluées le processus tumoral est souvent difficilement décelable, la nécrose éosinophile étant anhiste. Cependant, à la périphérie, on peut encore trouver une zone cellulaire active.

— *Les cellules* constituant la prolifération néoplasique sont isomorphes, avec des anomalies cellulaires nombreuses, mais sans monstruosités marquantes.

PLANCHE XV

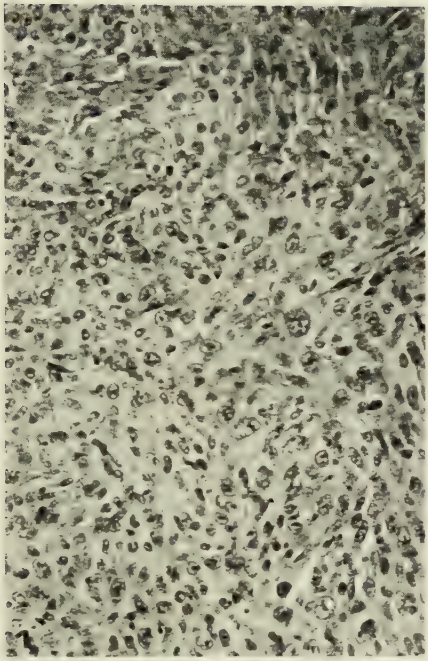
Aspect histologique du mélanome spontané transplantable « FORTNER-MOORE » 3e série.

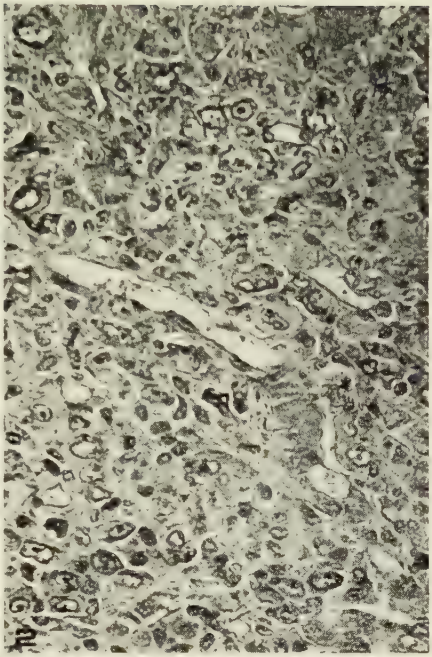
Figure 1 : Hamster 5.655 - Coupe 64.078. Mélanome « FORTNER-MOORE », 3e série, 11e passage. L'aspect de la tumeur est semblable à celui de la première série : indifférenciation, activité métastatique intense, pauvreté du stroma.

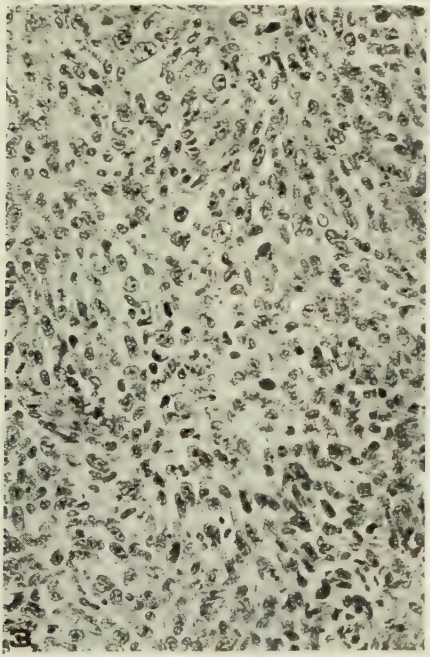
Figure 2 : Même animal que celui de la figure 1, montrant les dispositions périthéliales très fréquentes, sinon constantes dans ce type de tumeur.

Figure 3 : Hamster 5.222 - Coupe 61.164. Mélanome achromique transplantable « FORTNER-MOORE », 3e série, 6e passage. Une zone proliférative compacte.

Figure 4 : Hamster 5.222 - Coupe 61.164 - 3e série, 6e passage. Une vaste nécrose éosinophile pratiquement constante dans ces tumeurs très prolifératives à stroma inexistant.







— *Le cytoplasme* est assez abondant avec des limites cytoplasmiques qui ne sont pas toujours bien visibles.

— *Les noyaux*, souvent encochés, sont clairs, vésiculeux, avec une chromatine marginale. Le nucléole est très volumineux.

— *Les mitoses* sont extrêmement nombreuses, souvent très atypiques.

— Par les techniques habituelles, nous n'avons jamais mis en évidence de pigment.

— *Le stroma* est extrêmement pauvre, constitué de fines travées collagéniques.

Dans les zones d'envahissement ou dans les métastases, la disposition lobulée est plus apparente et la réticuline entoure les lobules sans les pénétrer.

2) *LA PROPAGATION TUMORALE LOCO-REGIONALE* (Pl. XIV, fig. 2) :

Les travées néoplasiques s'infiltrent en fins cordons ou en travées plus compactes, englobant les fibres musculaires qui apparaissent souvent comme une masse éosinophile, anhiste, au sein de la masse tumorale. Dans les territoires d'extension, on peut suivre les phénomènes dégénératifs progressifs des fibres musculaires striées, depuis la perte de la striation jusqu'à l'homogénéisation du sarcolemne et la disparition des noyaux.

Les animaux meurent en général avant l'atteinte osseuse.

3) *LES METASTASES :*

— *Les métastases pulmonaires* (Pl. XVI, fig. 2) sont certainement les plus fréquentes. Sur 76 animaux examinés, nous avons eu 28 métastases pulmonaires.

Nous avons pu suivre tous les aspects de la constitution de la métastase au niveau du parenchyme pulmonaire.

Dans le septum inter-alvéolaire, nous avons retrouvé parfois 2 ou 3 cellules tumorales embolisées dans le fin réseau capillaire. Dans un deuxième temps, les cellules cancéreuses s'extériorisent et provoquent une réaction lytique de par leurs sécrétions enzymatiques, protéolytiques (hyaluronidase). Arrive ensuite une réaction histio-fibrocytique qui constitue le stroma naissant. Dans la figure 2 de la planche XVI, on peut voir trois aspects successifs du phénomène que nous venons de décrire.

Par la suite, la prolifération cellulaire et stromale se continue et des nodules se forment ainsi, soit isolément, soit par confluence de plusieurs micro-nodules.

Une autre modalité de constitution de la métastase pulmonaire, au moins aussi fréquente que la précédente, est le point de départ sous-séreux. C'est ainsi que se constituent des nodules qui soulèvent la plèvre.

Lorsque l'évolution est plus ancienne, on peut assister à l'envahissement massif d'un lobe.

La localisation secondaire pulmonaire a le même aspect cytologique que la tumeur primitive. Cependant, la riche vascularisation permet une meilleure nutrition du processus néoplasique et l'on constate beaucoup moins de nécrose que dans les tumeurs primitives.

— *Les métastases hépatiques* sont plus rares, nous en avons dénombré dans cette série 11 sur 76 animaux. Le plus souvent micro-nodulaires, périportales. Elles se présentent par la suite sous forme de nodules. A un stade extrême, il y a un envahissement total d'un lobe hépatique.

— *Les métastases rénales* (Pl. XIV, fig. 3 et 4), 7 sur 76, atteignent la médullaire, les travées néoplasiques s'infiltrant entre les tubes rénaux, mais aussi la corticale. Il semblerait que le point de départ se fasse autour des glomérules dont la capsule est le plus souvent respectée.

Le floculus reste libre dans cette capsule et on voit souvent le glomérule comme un « îlot » au milieu d'une mer de cellules tumorales. Mais cette résistance finit également par céder et la destruction du glomérule en résulte. Le processus métastatique, là encore, paraît bien se faire par voie sanguine.

— *Les métastases cardiaques* sont relativement fréquentes, 10 sur 76 animaux.

Mais il paraît s'agir beaucoup plus d'une propagation d'une localisation secondaire péricardique au muscle cardiaque que d'une métastase vraie.

Les nodules péricardiques se réalisent comme au niveau de la plèvre et l'extension se fait ensuite au cœur lui-même.

— *Les métastases ganglionnaires* existent, mais elles sont beaucoup plus rares (2 sur 76 animaux), ce qui paraît normal étant donné la propension de cette tumeur à se propager par voie sanguine, comme beaucoup de mélanomes humains du reste. Toutefois, on doit noter que nous n'avons examiné que les ganglions les plus volumineux et que peut-être il existe des micro-métastases qui passent inaperçues.

— Les constatations macroscopiques concernant *le cerveau* sont confirmées par l'étude histologique systématique du cerveau. Etant donné justement la propagation vasculaire, on pouvait a priori penser trouver des localisations cérébrales. Il n'en a rien été sur les 76 cerveaux examinés.

c) **Etude histo-chimique et histo-enzymologique :**

1) *Coloration de la mélanine :* En présence de cette tumeur achromique qui provenait ancestralement d'une tumeur spontanée mélanique chromique, nous avons recherché si nous pouvions révéler par les colorations électives la mélanine.

A de nombreuses reprises, les essais de coloration de la mélanine, soit par la technique de MASSON, soit par la réaction de LILLIE (cf. 2e partie, Ch. III-4 ***), se sont révélés infructueux.

Les coupes sans coloration sont toujours restées blanches, sans aucune trace de pigment.

2) *Mise en évidence de la Tyrosinase ou Dopa-oxydase :* L'étude de la dopa-réaction s'est également révélée négative à de nombreuses reprises. Notre tumeur avait donc une absence de tyrosinase.

PLANCHE XVI

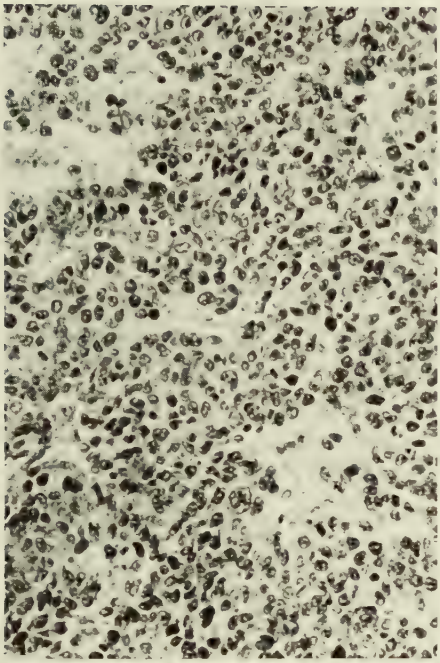
Comparaison histologique du mélanome du hamster « FORTNER-MOORE » entre les 1re et 2e séries et le mélanome induit DMBA.

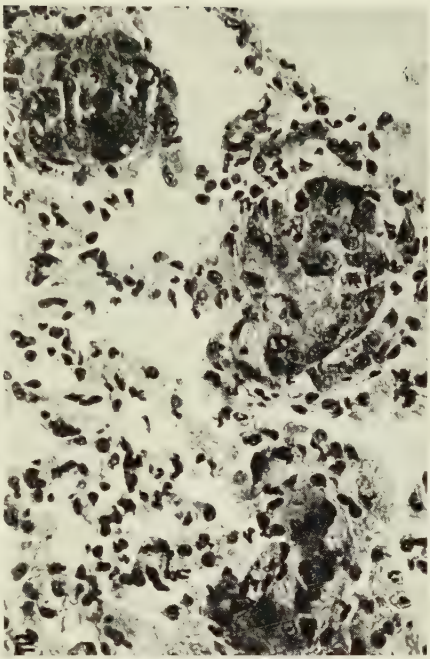
Figure 1 : Mélanome « FORTNER-MOORE », souche 87.341 transplantable. Il s'agit d'un mélanome achromique peu différencié, à disposition périthéliale (1re série).

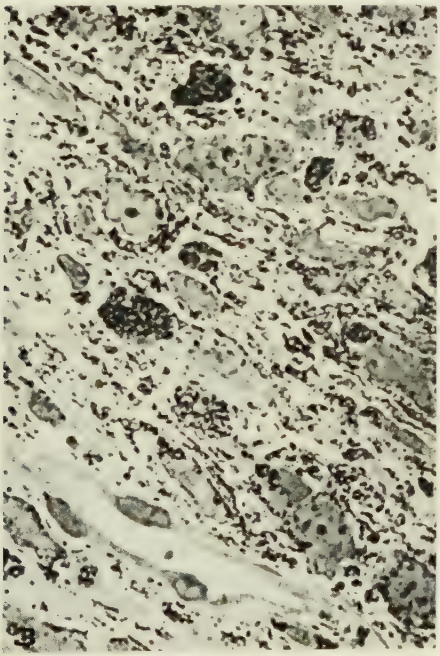
Figure 2 : Métastase pulmonaire à sa phase de début du même mélanome spontané transplantable du hamster doré (1re série).

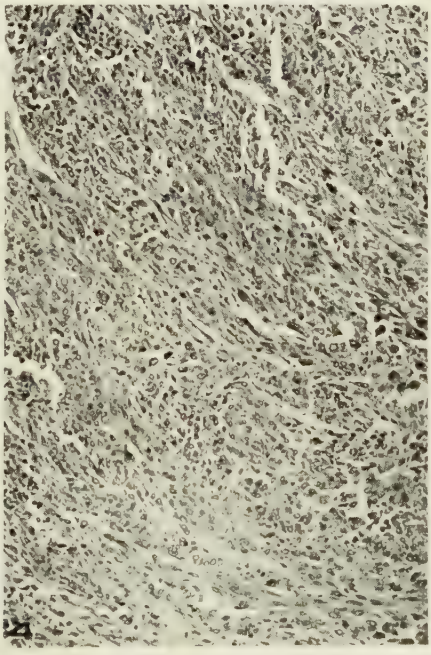
Figure 3 : A titre comparatif, coupe semi-fine d'un mélanome sous-cutané chimio-induit par le DMBA du hamster doré. On doit souligner l'abondance du pigment mélanique en « gros grains » dans les mélanophages.

Figure 4 : Aspect « inattendu » de la tumeur transplantable du mélanome FORTNER, souche MOORE 87.341, après séjour en azote liquide. Immunologiquement, cette tumeur avait des antigènes de type mélanome cytoplasmiques et des antigènes nucléaires de type viral.









Il était en conséquence indispensable de faire une étude au microscope électronique pour connaître l'ultrastructure de cette cellule qui, sur le plan histologique, se révélait extrêmement pauvre de par son indifférenciation.

d) **Etude ultrastructurale :**

Cette étude a porté sur le hamster 3.762 qui a présenté la première tumeur après inoculation de la souche 87.341, le 10 janvier 1969. Par la suite, le 5e passage et tous les passages du 8e au 14e, furent examinés en microscopie électronique (hamsters nos 3.902, 4.040, 4.091, 4.253, 4.265, 4.304, 4.328, 4.380).

La première constatation qui recoupe celle de l'histologie est la constance des aspects cellulaires.

Les coupes semi-fines montrent un tapis cellulaire monomorphe mêlé à quelques éléments de la lignée sanguine et quelques rares fibrocytes.

1) *A l'ultrastructure,* les cellules ont *un cytoplasme* clair. Dans ce cytoplasme, on trouve des mitochondries nombreuses, le plus souvent irrégulières, parfois altérées. Les lamelles ergastoplasmiques sont rares. Les ribosomes sont disposés en rosettes et libres.

L'appareil de GOLGI, quand il est intéressé, par les plans de coupe, est normal.

Les activités sécrétrices sont assez rares, mais il y a cependant quelques structures très osmiophiles ne pouvant être assimilées à des mélanosomes, car nous n'avons jamais rencontré de structure fibrillaire caractéristique de la protéine de soutien des mélanosomes (Pl. XVII et XVIII), ni de pré-mélanosomes.

2) *Le noyau* est très irrégulier, comportant de nombreuses encoches et des images de ponts nucléaires. La chromatine est irrégulièrement répartie contre la membrane nucléaire.

— Les nucléoles sont très volumineux.

3) *Les membranes* cellulaires ont une disposition irrégulière avec quelques rares micro-villosités. Les espaces inter-cellulaires sont bien visibles. Il y a peu ou pas de collagène. On ne note la présence d'aucun desmosome entre ces cellules.

La coloration au rouge de ruthenium pratiquée par J.-P. CESARINI a mis en évidence une épaisseur de glycocalixe très supérieure à la normale, comme cela se voit normalement dans les cellules cancéreuses.

4) Les éléments d'accompagnement sont constitués par quelques polynucléaires (Pl. XVIII, fig. 2) et des cellules dégénératives à noyaux pycnotiques.

Ainsi l'ultrastructure, pas plus que l'histo-chimie et l'histo-enzymologie, n'a permis de mettre en évidence de structures figurées qui caractérisent morphologiquement les mélanomes, tout au moins ceux qui n'ont pas une délétion de la protéine de soutien et de l'enzyme, nécessaires à la synthèse de la mélanine. Enfin, il faut noter un fait, conséquence probable de ce que nous venons de dire, c'est que les tumeurs transplantées sur hamsters # Albinos sont exactement les mêmes que sur les hamsters dorés.

B) Le mélanome spontané transplantable " Fortner-Moore " 2e série :

Après son 14e passage, la première série de la tumeur spontanée transplantable (souche 87.341) s'étant éteinte par une mort brutale des animaux en expérience, il a fallu recommencer toute l'expérimentation pour avoir le matériel nécessaire aux travaux d'essais thérapeutiques à visée immunologique en février 1970.

Le tableau II a montré la filiation de cette 2e série qui a utilisé des cellules en culture, 9e sub-culture de la première tumeur obtenue dans le service, celle du hamster 3.762, qui avait été conservée en azote liquide. Il y a eu ainsi 19 passages d'animal à animal, soit 70 hamsters en expérience.

Les examens ont porté sur 16 animaux, un par passage de souche, les animaux des derniers passages n'ont pas encore été sacrifiés.

Les tumeurs obtenues se sont montrées immédiatement très différentes de la première série et nous avons étudié principalement ces différences.

a) **Etude macroscopique :**

1) *L'aspect clinique* des animaux a été le même et le délai d'apparition des tumeurs, ainsi que leur croissance, est resté le même.

2) *A l'exérèse,* les tumeurs, par contre, ont montré immédiatement un aspect extérieur très différent. Les néoformations étaient nodulaires, adhérentes, de coloration rosée et non rouge vineux et friables. La consistance était ferme et les zones nécrotico-hémorragiques peu importantes.

3) *A l'autopsie,* nous notons une adhérence aux plans voisins ; par contre, les processus métastatiques ne sont pas décelés.

b) **Etude histologique :**

1) *Les tumeurs transplantées* se sont toutes montrées de morphologie différente (Pl. XVI, fig. 4).

— *L'aspect général* au fort grossissement frappe de suite : la prolifération en nappes compactes et souvent périthéliale est constituée de cellules assez volumineuses, fusiformes à disposition fasciculée.

— *Les cellules,* au protoplasme plus abondant que pour les tumeurs de la première série, ont des limites cytoplasmiques marquées. Elles sont ovoïdes ou fusiformes, selon les axes de coupes.

— *Les noyaux* sont très irréguliers, très foncés, pycnotiques, souvent irréguliers dans leurs contours. Les monstruosités nucléaires sont plus marquées et plus nombreuses.

— *Les mitoses,* le plus souvent atypiques, sont nombreuses.

— *Le stroma* est pauvre, constitué de fines travées collagéniques.

2) *Les propagations* loco-régionales se sont formées de la même façon que pour la première série, mais semblent moins prononcées.

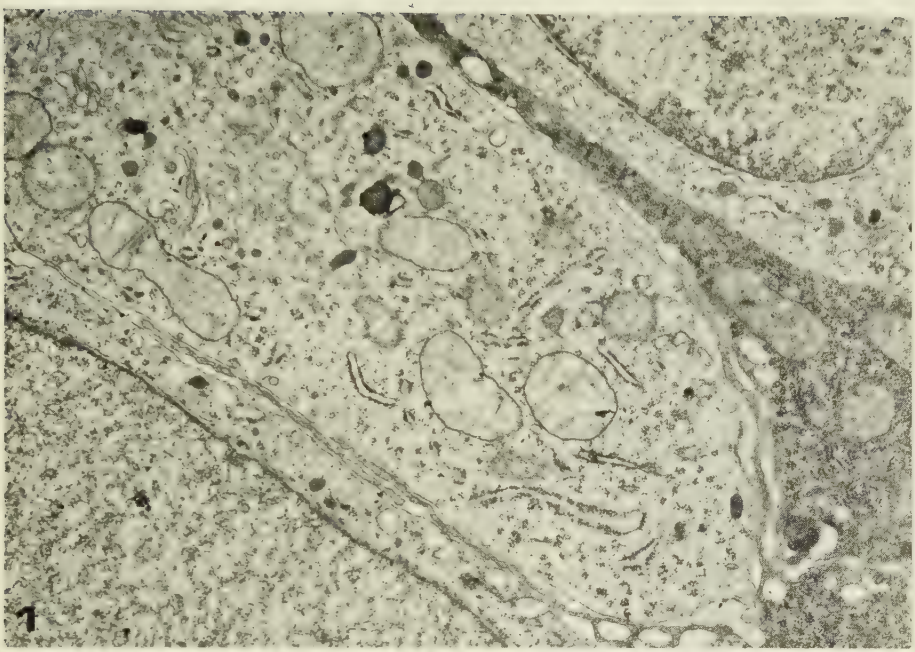
3) *Les métastases* sont extrêmement rares, mais nous ne pouvons tenir compte de nos chiffres, car ceux-ci ne sont pas comparables avec ceux de la première série où tous les animaux ont été examinés. Pour cette série,

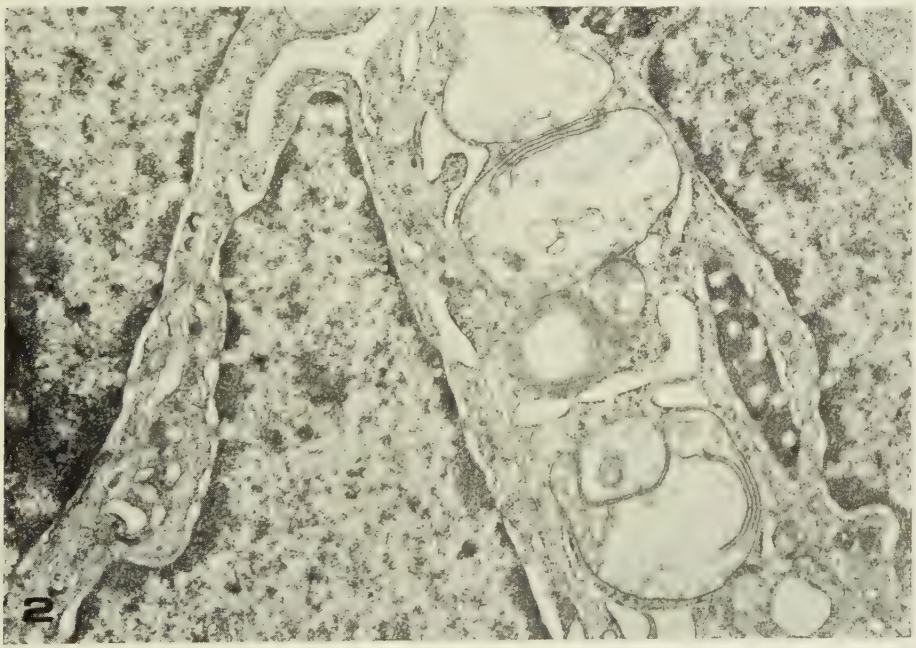
PLANCHE XVII

Ultrastructure du mélanome du hamster type FORTNER-MOORE (hamster N° 3.762). C'est la première tumeur obtenue.

Figure 1 : Cellules très claires avec quelques lamelles ergastoplasmiques. Les mitochondries sont de taille et de formes irrégulières « ballonisées », altérées. Les ribosomes sont isolés ou en rosette. Il n'y a pas de desmosome. On note la présence d'organites très osmiophiles, mais on ne peut mettre en évidence des structures protéiques correspondant aux mélanosomes. Il s'agit d'une cellule mélanocytaire maligne.

Figure 2 : Dans la même tumeur, une zone nucléaire d'un mélanocyte malin. Le noyau a un contour irrégulier avec une margination chromatinienne.


1


2

il n'y a eu que 16 autopsies actuellement, pour lesquelles nous n'avons rencontré que deux métastases pulmonaires microscopiques. Ces métastases avaient les mêmes caractéristiques que dans la première série, à cela près que les cellules étaient fusiformes et que le stroma paraissait un peu plus abondant dans les septa inter-alvéolaires.

c) **Etude histo-chimique et histo-enzymologique :**

La coloration de la mélanine a été négative, de même que la recherche de l'activité tyrosinasique par la Dopa-réaction.

d) **Etude ultrastructurale :**

Etant donné les différences morphologiques, macroscopiques et histologiques des tumeurs de cette 2e série, l'étude ultrastructurale pouvait peut-être nous donner une aide.

Les examens électroniques ont été faits sur 12 passages. Mais tout l'intérêt devait se concentrer sur les cellules d'origine de cette néoformation et en particulier la 9e sub-culture de la tumeur primitive du hamster 3.762, qui avait été vue en électronique (Pl. XVII).

L'examen ultrastructural a amené les constatations suivantes sur les cellules d'origine.

— Il y avait de nombreux signes de dégénérescence, en particulier nucléaires, pycnose et caryorexie sur un grand nombre de cellules.

— Les autres cellules étaient cependant sécrétantes, mais sans caractères de différenciation et en particulier une absence totale de prémélanosomes ou de mélanosomes.

— Un élément capital à retenir par contre était la présence dans le cytoplasme des cellules dégénératives, de corps arrondis, avec une capside, qui paraissaient bien être des micro-organismes type P.P.L.O., soit un gros virus.

Par contre, l'examen par la suite des différents passages a révélé des cellules dont la morphologie ultrastructurale était très proche des cellules que l'on rencontre dans la première série (Pl. XIX).

Les cellules tumorales possèdent un cytoplasme abondant, relativement riche en organites. Les mitochondries sont abondantes. Il y a de nombreuses vésicules, tantôt denses, tantôt claires.

Les membranes cellulaires ne possèdent pas de desmosomes.

— Les espaces inter-cellulaires contiennent très peu de collagène.

— Dans ces examens, on ne décèle plus de corpuscules type P.P.L.O. ou viraux.

Ainsi les constatations morphologiques de l'histologie ne correspondent pas à des modifications ultrastructurales importantes dans la constitution même de la cellule tumorale en cause.

C) La mélanome spontané transplantable " Fortner-Moore " 3e série :

En raison des déboires de la 2e série expérimentale et de l'incertitude qui pouvait régner sur sa nature exacte, en juillet 1970, il faut décider de tout reprendre à zéro.

On est donc revenu à la cellule souche qu'avait envoyé MOORE sous la dénomination FORTNER # 5 N° 87.341, qui, après 9 sub-cultures, avait été conservée en azote liquide. Actuellement, en juillet 1971, 11 passages ont été effectués.

Nous ne reprendrons pas sa description morphologique, car elle est en tous points semblable à la première série, ce qui était le but exact de cette expérimentation.

Elle est en effet identique au point de vue histologique (Pl. XV) et ultrastructural.

Dans les 5 examens au microscope électronique, aucun micro-organisme n'a été décelé (hamsters 4.917, 4.932, 5.013, 5.105, 5.145).

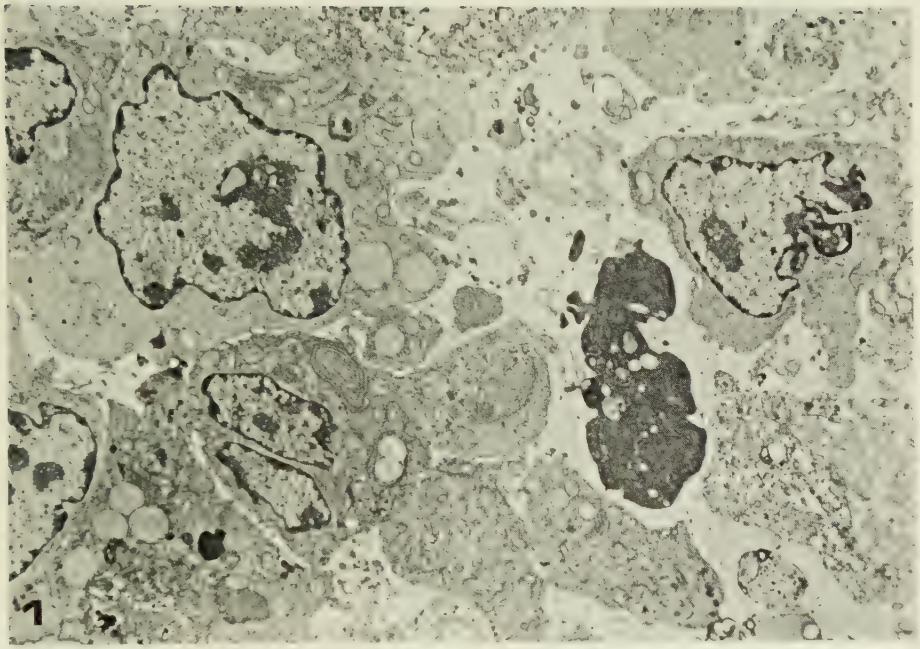
Toutefois, sur les 9 autopsies que nous avons eu à examiner, nous n'avons décelé aucune métastase.

PLANCHE XVIII

Ultrastructure du mélanome FORTNER-MOORE (hamster 4.441), 1re série, 14e passage.

Figure 1 : Aspect général de la tumeur comportant des cellules tumorales et de nombreux éléments en voie de lyse.

Figure 2 : Autre aspect général qui montre également l'importance des zones dégénératives, avec un polynucléaire neutrophile (à droite). Ces aspects correspondent à ceux qui sont vus en histologie (Planche XV, fig. 4).


1

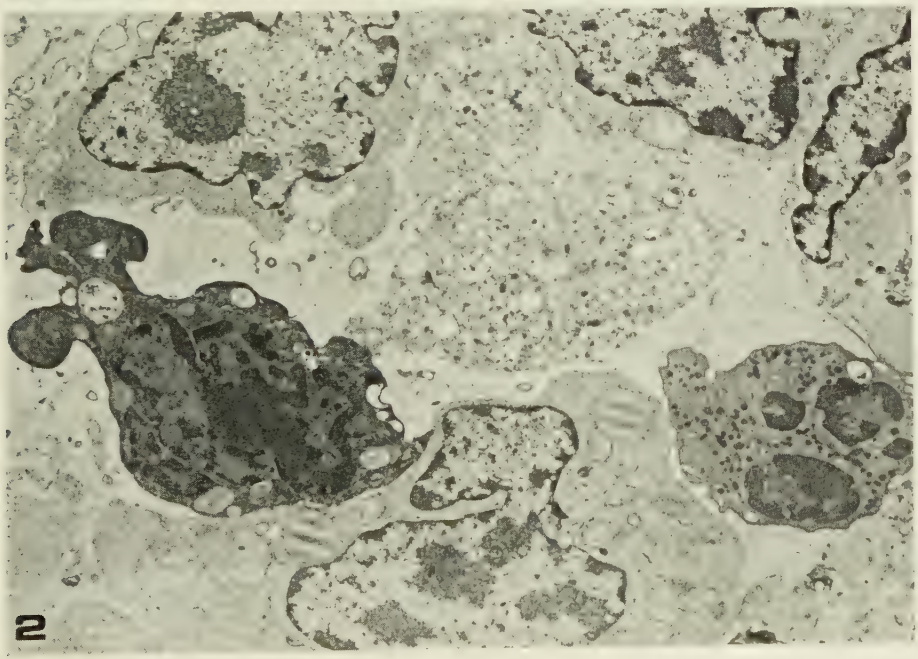
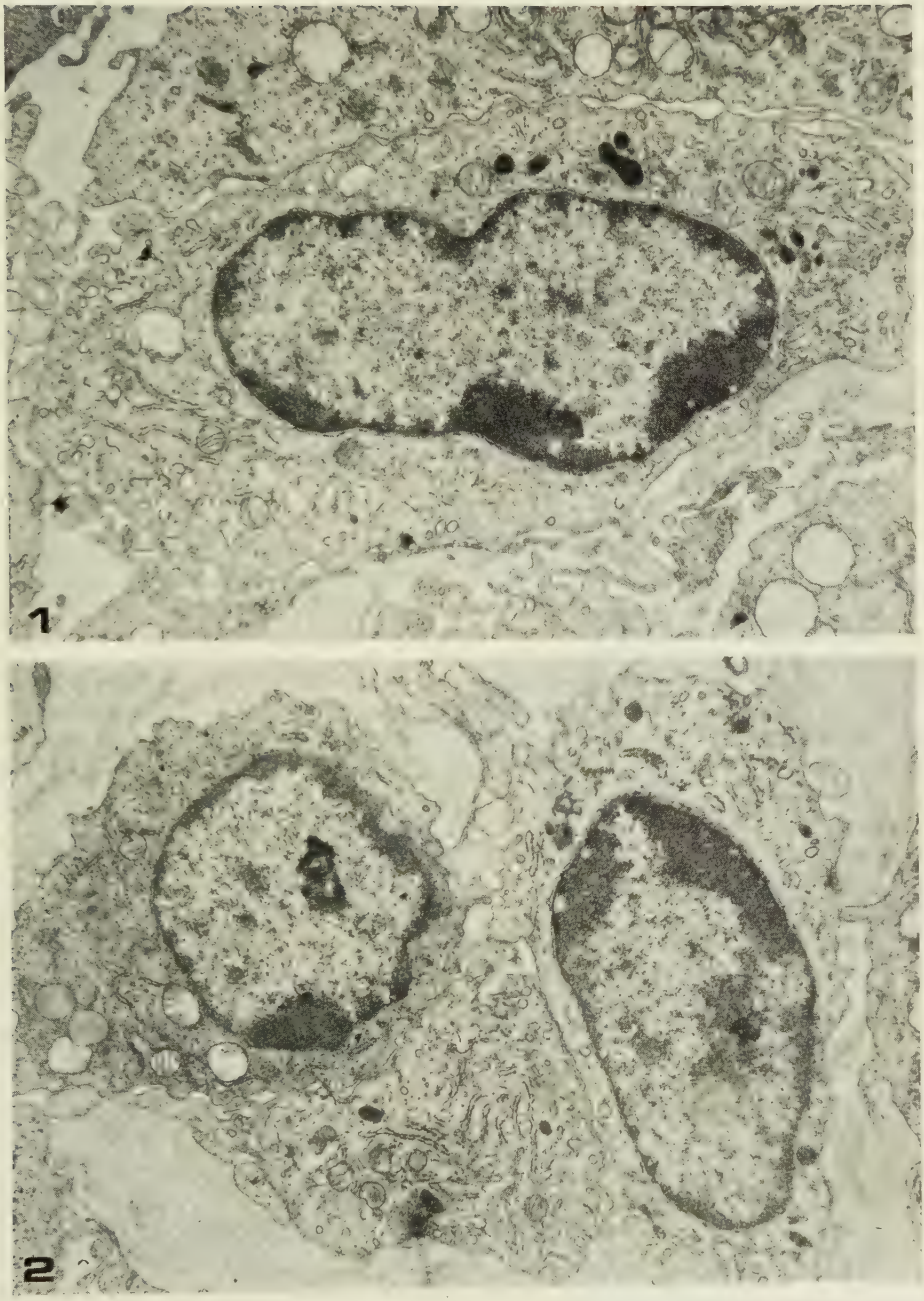

2

PLANCHE XIX

Ultrastructure du mélanome FORTNER-MOORE (hamster 5.175), 2e série, 13e passage (2.592 ME).

Figure 1 : Une cellule tumorale avec un cytoplasme abondant, relativement riche en mitochondries dysplasiques. On voit de nombreux corps très denses qui pourraient en imposer pour des mélanosomes. Mais une recherche très attentive n'a jamais mis en évidence de prémélanosomes. Ces corps denses ont toujours une membrane unique.

Figure 2 : Deux autres cellules présentant les mêmes caractéristiques. On doit noter la disposition « en mottes » et en « croûte » de la chromatine. Ce sont des mélanocytes malins.


1
2

— II —

MELANOME CHIMIO-INDUIT PAR LE D.M.B.A. CHEZ LE HAMSTER

Nous rappelons que 81 hamsters ont été mis en expérimentation pour l'étude des tumeurs mélaniques induites par le D.M.B.A. 20 ont reçu une instillation de D.M.B.A., 10 ont eu une instillation du support (huile d'olive), 23 ont servi à des essais de greffes et de transplantations pour les tumeurs chromiques et 28 pour la tumeur achromique.

Actuellement, un grand nombre d'animaux sont encore vivants et les examens histologiques ont porté surtout sur des animaux morts rapidement et sur les exérèses de tumeurs.

A) Les tumeurs chromiques primitives :

Longues à apparaître, 8 mois en moyenne, elles se présentent toutes de la même façon.

a) **Etude macroscopique :**

1) *L'examen clinique* régulier des animaux montre au début, en rebroussant le poil, des petites plaques noirâtres qui se soulèvent progressivement pour donner une papule noir anthracite, parfois légèrement bleutée rappelant le « lentigo » humain.

D'abord unique, ces nodules se multiplient et avec le temps s'accroissent régulièrement. Lorsque l'on rase les animaux dans la région atteinte, le plus souvent la région dorsale (Pl. X, fig. 3 et 4), on s'aperçoit que certaines tumeurs sont volumineuses alors que d'autres sont lenticulaires ou même miliaires.

Si, comme nous l'a montré AUBERT (communication personnelle), lors de la mort d'un animal, on le dépouille complètement de sa peau, on constate que les tumeurs sont dermiques et hypodermiques, et qu'elles n'adhèrent pas aux plans profonds. Cette méthode, en tannant la peau, permet d'avoir un document comparatif à un moment donné, si l'on veut étudier les différences obtenues par les différences de doses ou par des produits carcinogènes différents (uréthane).

2) *A l'exérèse,* ces tumeurs nodulaires incluses dans le derme moyen et profond, ainsi que l'hypoderme superficiel, sont à la coupe noir anthracite, de consistance molle, peu hémorragiques.

3) *A l'autopsie,* les animaux que nous avons eus n'ont pas révélé à ce jour de processus métastatique. Du reste, AUBERT (165-166 et 167) signale que les métastases sont exceptionnelles dans ces tumeurs et elles sont alors pulmonaires et hépatiques.

b) **Etude histologique :**

1) *Les tumeurs* se présentent sous l'aspect d'un nodule s'étendant du derme moyen au derme profond, avec atteinte de l'hypoderme.

— *Le revêtement malpighien* traversé par les poils de l'animal reste parfaitement normal.

— *Le derme* est occupé massivement par une masse cellulaire si fortement pigmentée que l'on discerne très difficilement les cellules.

— Entre l'épiderme et *le nodule « noir », on trouve* dans le derme réticulé des îlots pigmentés (pl. XX, fig. 3).

— Dans cette masse sombre, sont englobées les formations pilo-sébacées et la gaine des poils est très nettement surpigmentée (Pl. XX - Fig. 2).

— *Les cellules* sont très difficiles à analyser et pour cela nous avons tenté plusieurs méthodes de décoloration du pigment pour mieux voir les détails nucléaires (cf. 2 partie Ch. III-B).

Ainsi on peut voir deux types d'éléments cellulaires, les uns à prolongements dendritiques à pigment finement granuleux, poussiéreux, les mélanocytes et les autres, arrondis, à noyau encoché, bourrés de « gros grains », les mélanophages. Nous n'avons pas trouvé d'anomalies nucléaires patentes sur nos prélèvements. On peut du reste sans décoloration distinguer ces deux types de cellules sur la figure 3 de la planche XX dans la partie droite au niveau du derme où l'on trouve des cellules souvent triangulaires légèrement pigmentées, à côté de masses sombres de mélanophages.

Ces constatations histologiques assez difficiles, malgré tout, ont été considérablement éclaircies par les coupes semi-fines faites sur les inclusions pour la microscopie électronique. Sur ces préparations, on voit que le pigment est à la fois intra et extra-cellulaire et il est coloré en vert par le Bleu de Toluidine. L'image 3 de la planche XVI met bien en évidence les deux types cellulaires mélanocytes qui apparaissent « clairs » et les mélanophages très fortement pigmentés.

Ces constatations histologiques sont tout à fait superposables aux constatations faites antérieurement par DELLA-PORTA (57), GHADIALLY (58-168), RAPPAPORT, PIETRA et SHUBIK (61-63), CHERNOZEMSKI (169-170-171) dans les tumeurs induites par le D.M.B.A.

Ces aspects sont différents des mélanomes induits par l'uréthane, qui ont été décrits par RIVIERE, OBERMAN, ARNOLD et GUERIN (69-172).

2) *Les extensions.*

Les nodules tumoraux sont d'abord uniquement sous-épidermiques et intradermiques. Lorsqu'ils s'accroissent, ils atteignent l'hypoderme et refoulent le tissu adipeux ou l'infiltrent très peu. Il n'y a jamais d'extension musculaire comme dans le mélanome de FORTNER-MOORE.

Les études histologiques des autopsies confirment les données macroscopiques et nous n'avons pas mis en évidence de métastases hépatiques ou pulmonaires.

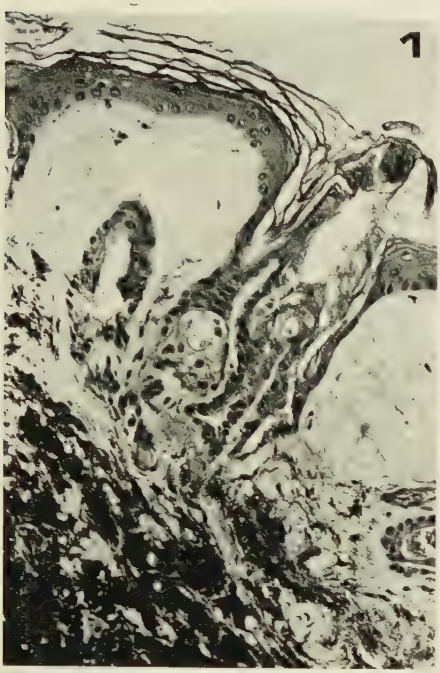
PLANCHE XX

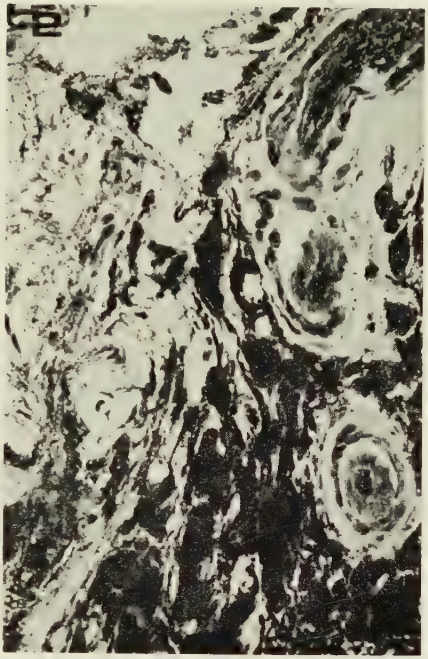
Aspect histologique de la tumeur chimio-induite par le DMBA chez le hamster 5.047. Examen 61.878 C.R.A.C.M.

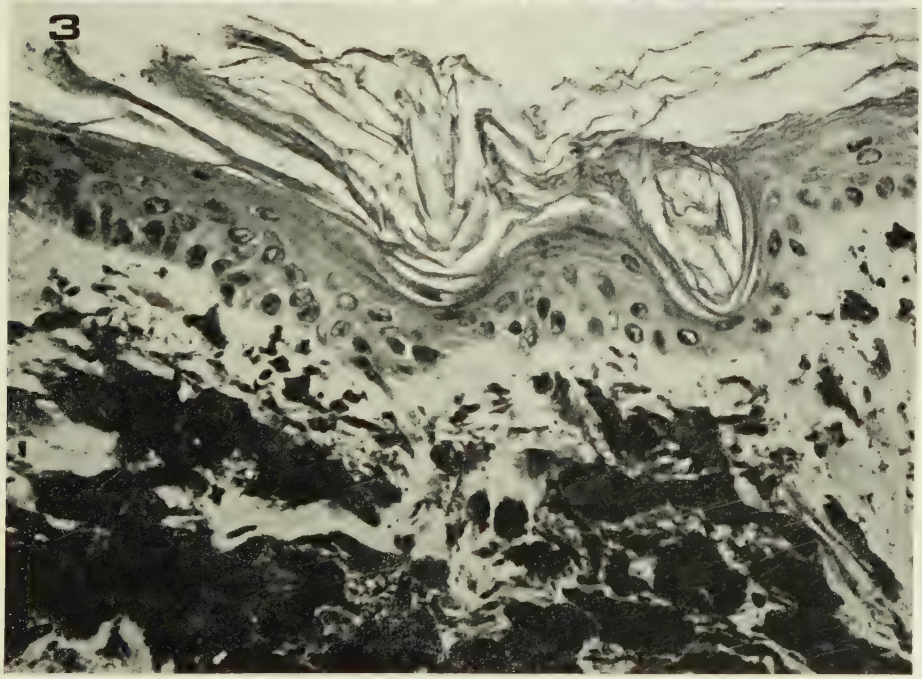
Figure 1 : Sous l'épiderme, dans le derme réticulé, à la base des poils, une formation nodulaire hyper-pigmentée.

Figure 2 : Un aspect de cette infiltration par des cellules souvent fusiformes, qui se disposent autour des follicules pileux.

Figure 3 : Un aspect infiltratif plus superficiel. On ne distingue que très difficilement la structure des cellules bourrées de pigment mélanique. Dans la partie droite de la figure, on peut cependant discerner quelques rares cellules triangulaires, plus claires, qui sont des mélanocytes. Au niveau de l'épiderme, on trouve quelques mélanocytes normaux entre les kératinocytes.


1


2


3

c) **Etude histo-chimique :**

La richesse de la pigmentation rend inutile les recherches histo-chimiques et histo-enzymologiques. Cependant, nous avons vu l'utilité parfois de la dépigmentation pour l'étude des détails cytologiques. Par ailleurs, la coloration de la réticuline met en évidence la disposition alvéolaire par endroits des cellules.

d) **Etude ultrastructurale :**

Il faut dès l'abord préciser que cette tumeur très fortement chromique, comme celle du cheval du reste, pose à la technique électronique certaines conditions, faute de quoi l'examen devient très difficile.

Les grilles pratiquées selon les techniques habituelles ne résistent pas aux faisceaux électroniques, en raison de la densité du pigment.

Il faut donc faire des inclusions en matériaux durs et faire les coupes au diamant (Communication orale de J.-P. CESARINI).

Nous avons pu avoir cependant par les techniques habituelles quelques grilles qui ont résisté aux faisceaux d'électrons et qui nous ont permis l'étude qui suit (Pl. XXI). On distingue très nettement deux types de cellules : des mélanocytes et des histiocytes macrophagiques ou encore mélanophages.

1) LES MELANOCYTES :

L'aspect général de la cellule est sensiblement normal.

— *Le cytoplasme* présente une activité sécrétrice importante avec un appareil de Golgi normal.

— *Les ribosomes* sont isolés et en rosettes.

— *Les mitochondries* sont rares et parfois altérées.

— *Les mélanosomes* sont beaucoup plus abondants qu'à l'état normal et paraissent être en rétention dans les cellules.

Ils sont très fortement osmiophiles et il est très difficile d'y discerner la structure protéique. Cependant sur une préparation (Pl. XXI - Fig. 2), à fort grossissement (GX 50.050), on peut étudier le détail des anomalies de structure des mélanosomes : absence de limitation membranaire, asynchronisme de maturation, dystrophie de la protéine.

Ces mélanosomes peuvent avoir des aspects en « cocarde » ou en « croissant ».

2) LES MELANOPHAGES (Pl. XXI, fig. 3) :

Ils sont très nombreux et ne présentent pas de caractères particuliers si ce n'est que l'on trouve dans les phagosomes les mêmes anomalies de structure des mélanosomes.

B) Les tumeurs greffées et transplantées :

Plusieurs essais de transplantation et de greffes ont été effectués avec les tumeurs primitives induites par le carcinogène chimique. On a utilisé soit la greffe au trocart d'un fragment de tumeur, soit l'inoculation de cellules trypsinées. Jusqu'à présent, une seule tumeur greffée a pris sur le hamster 5412 et a pu être transplantée deux fois.

a) **Etude macroscopique :**

Ces tumeurs placées sous la peau de la région dorsale de l'animal se développent extrêmement lentement et il faut savoir attendre surtout pour les premières greffes dont le potentiel de malignité est certainement peu important.

Lorsqu'elle se développe, la tumeur soulève la peau et forme un nodule semblable à ceux de la tumeur primitive.

b) **Etude histologique et ultrastructurale :**

L'étude de ces tumeurs dont nous n'avons eu que deux exemplaires est peu différente de celle des tumeurs primitives, que ce soit en histologie ou en microscopie électronique.

C) Les tumeurs achromiques « inattendues » induites par le D.M.B.A. :

Comme nous l'avons indiqué dans la provenance de nos tumeurs, nous avons eu plusieurs néoformations « inattendues » qui n'entrent pas dans le cadre de ce travail mais que nous devons mentionner.

1. — Sarcome fibroblastique du hamster 5056 # Albinos.

Le hamster # albinos 5056 a subi dans une même série de hamsters dorés, une injection de D.M.B.A. à la sonde. Il a présenté au niveau de l'œil et de la tête, une volumineuse tumeur ulcéro-nécrotique dont il meurt avec métastases.

Il s'agissait d'un sarcome fibroblastique qui était parfaitement transplantable et cultivable. On peut éliminer l'hypothèse d'un mélanome à forme sarcomatoïde en l'absence totale de pigment et de réaction histo-chimique et l'absence en microscopie électronique, de mélanosomes.

De plus sa biologie est celle habituelle des sarcomes du hamster, qu'ils soient viro-induits ou chimio-induits, en particulier du point de vue de ses réactions immunologiques.

2. — Adénome pilo-sébacé de la paupière du hamster 5045.

Dans la même série, nous avons eu chez le hamster 5045, un adénome sébacé tout à fait typique.

3. — Tricho-épithéliome du Hamster N° 5036.

Parmi nos animaux, le hamster 5036 a fait au niveau de la patte postérieure droite une tumeur qui est un tricho-épithéliome.

A propos de ces trois tumeurs très certainement en rapport avec l'ingestion du D.M.B.A., nous devons noter que jamais dans l'élevage du Laboratoire qui compte maintenant plus de 6.000 hamsters, on a trouvé de telles tumeurs spontanées.

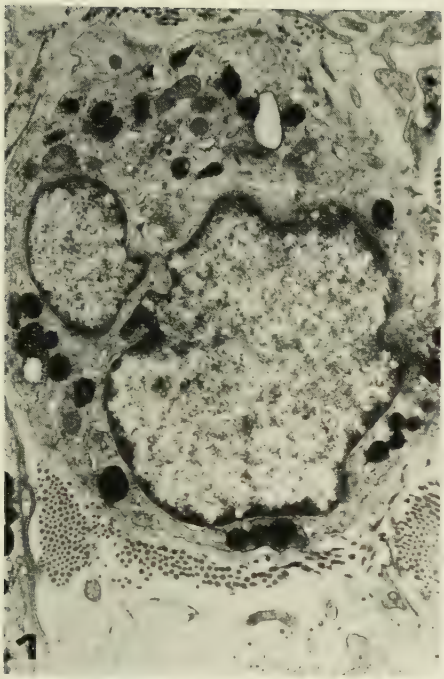
PLANCHE XXI

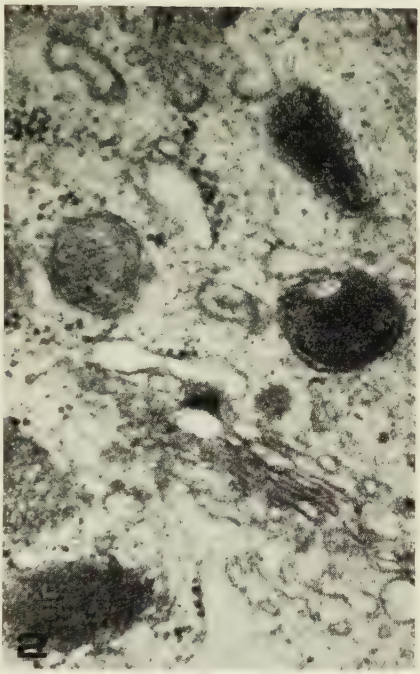
Ultrastructure de la tumeur mélanique induite par le DMBA chez le hamster 5.045 (ME 2.653).

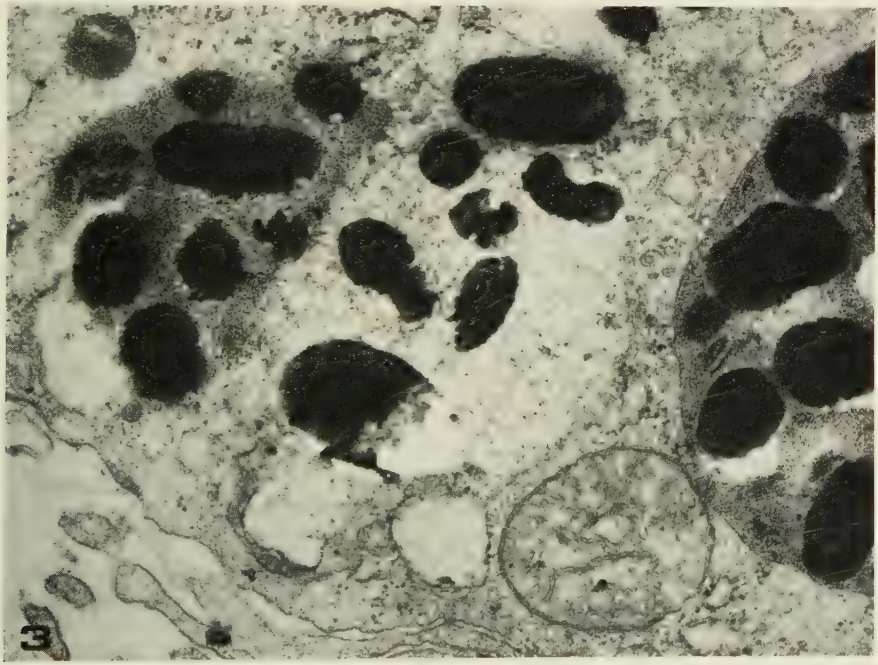
Figure 1 : Un mélanocyte englobé dans une trame collagénique. Le noyau est assez régulier, avec une chromatine normale. Dans le cytoplasme apparaissent de nombreux mélanosomes à différents stades de maturation.

Figure 2 : Différents types de mélanosomes dysplasiques, dont un immature dans le cytoplasme d'un mélanocyte.

Figure 3 : Nombreux mélanosomes irréguliers dont certains sont en voie de destruction (au centre). A gauche et à droite, ces mélanosomes sont contenus dans les phagosomes. Il s'agit d'un mélanophage.


1


2


3

— III —

LES TUMEURS MELANIQUES DU CHEVAL

(71 à 79)

L'étude morphologique des tumeurs équines s'est faite sur une dizaine de chevaux et en particulier sur une observation privilégiée qui est l'observation X (2e partie ch. II-III).

a) **Etude macroscopique :**

Les vérifications anatomiques nous ont permis plusieurs constatations. Les localisations les plus fréquentes sont :

— la région anale et pelvienne
— la surface du psoas
— la région de la quadrifurcation de l'aorte postérieure
— la face interne des côtes avec des localisations sous-pleurales
— la face interne de l'épaule
— la région du ligament cervical
— la région de la base de la langue et des ganglions sous-glossiens.

Il existe des mélanoses localisées qui sont à peu près exclusivement l'apanage des chevaux gris, bien que les équidés de robe sombre présentent très rarement des mélanomes, mais non d'une façon absolue et dans le cas d'atteinte, les lésions sont très peu nombreuses.

L'aspect est celui de tumeurs nodulaires dont la coloration noire charbon ne permet aucun doute sur son étiologie. Ces nodules sont souvent reliés entre eux par des traînées noires qui correspondent à l'injection des lymphatiques.

Le volume va de la taille d'une lentille jusqu'à celui d'une tête d'adulte.

A la coupe ces nodules sont durs, de coloration anthracite.

b) **Etude histologique :**

a) *La tumeur :* La description histologique de l'ensemble de ces tumeurs est très stéréotypée ; la plupart du temps, les coupes histologiques apparaissent tellement pigmentées que l'on reconnaît difficilement les cellules, à telle enseigne qu'au cours de nos derniers examens nous avons tenté une décoloration de nos coupes.

On peut cependant dire que l'ensemble des tumeurs sont constituées par de volumineuses cellules soit isolées, soit groupées, donnant apparemment l'aspect de cellules gigantesques (Pl. XXII, fig. 1 et 2). Dans l'infiltra-

tion des tissus, soit au niveau des muscles, ce qui est le plus fréquent, soit même au niveau du myocarde, on peut cependant distinguer deux types de cellules comme l'avaient du reste signalé DRIEUX H. et PRAT J. (92).

Les unes à noyau assez clair fortement nucléolé ont un cytoplasme abondant, dans lequel on rencontre des grains de mélanine (Pl. XXII, fig. 4). Pour nous, ces cellules correspondent au mélanocyte qui secrète la mélanine et qui ensuite « injecte » les autres cellules de type macrophagique ; ce sont des éléments qui apparaissent absolument noirs sans que l'on puisse discerner les noyaux ; ce sont du reste les acquisitions récentes de l'ultra-structure qui nous permettent cette affirmation.

b) *Les métastases :* Deux processus métastatiques sont absolument certains :

— a - *La voie vasculaire :* Nous avons trouvé des envahissements certains, en particulier dans l'endocarde (Pl. XXII, fig. 3), certains vaisseaux veineux étant embolisés par une prolifération néoplasique.

— b - *La voie lymphatique* est également indubitable (Pl. XXII, fig. 2) et nous avons trouvé des envahissements dans les lymphatiques du tissu cellulo-adipeux en continuité directe avec les ganglions lymphatiques.

Du reste, dans ces ganglions on trouve des sinus distendus par des embols néoplasiques.

Nous ne reviendrons pas sur les localisations anatomiques des métastases qui ont été décrites plus haut, au point de vue macroscopique, mais nous insisterons sur deux métastases qu'il nous a été donné d'examiner : une métastase cardiaque (Pl. XXII, fig. 4) et une métastase méningée au niveau du cerveau.

c) **Etude histo-chimique et histo-enzymologique :**

L'importance du pigment dans ces tumeurs comme dans celles chimio-induites a rendu pratiquement inutile l'étude histo-chimique.

Là encore, les efforts ont porté sur la dépigmentation. De plus, la grande quantité de matériel tumoral a fait que l'étude biochimique a prévalu sur les études histo-chimiques et nous verrons les résultats de ces recherches.

d) **Etude ultrastructurale :**

a) *Etude de la tumeur :* Cette étude a posé des problèmes techniques difficiles, les mêmes que ceux du mélanome D.M.B.A. La plupart de nos coupes sont véritablement détruites par le bombardement des électrons. Nous avons pu néanmoins obtenir quelques clichés (Pl. XXIII, fig. 1, 2 et 3).

Cette étude a fait apparaître que le mélanosome du cheval est assez comparable à celui de l'homme, encore que sa taille soit un peu plus grande ; sa forme est celle d'un « ballon de rugby ».

Mais ce qui doit retenir l'attention c'est que l'on retrouve, au niveau des tumeurs mélaniques du cheval, les mêmes états dysplasiques que l'on rencontre dans le mélanome malin humain. En effet, les mélanosomes peuvent se présenter à différents stades de maturation avec une protéine irrégulière,

PLANCHE XXII

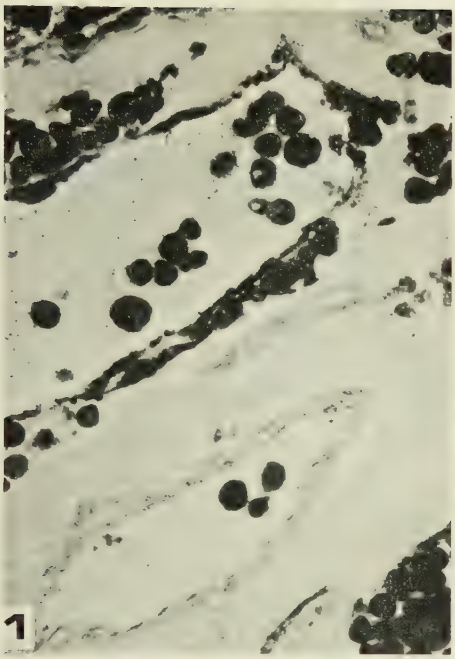
Aspect histologique du mélanome du cheval.

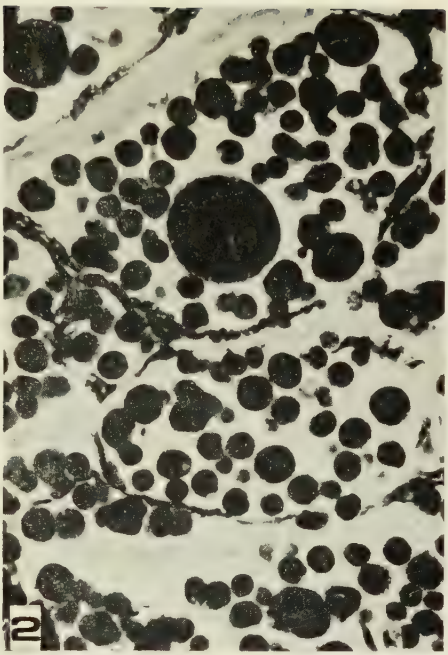
Figure 1 : Coupe N° 62.192 - C.R.A.C.M. - Cheval N° 9. Aspect d'envahissement péri-vasculaire et intra-vasculaire au niveau d'un muscle.

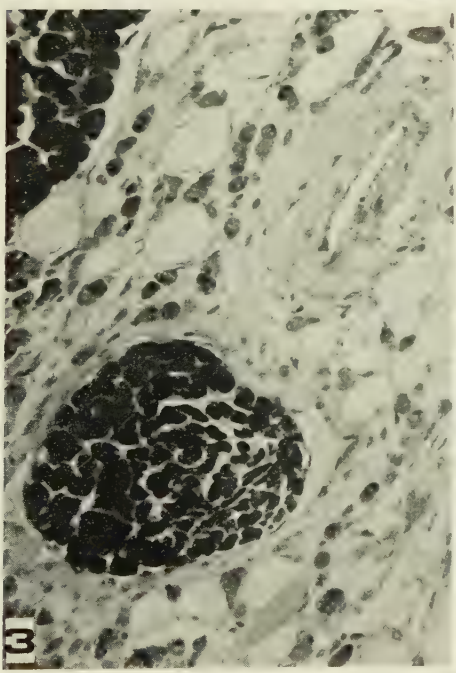
Figure 2 : Coupe N° 62.193 - C.R.A.C.M. - Cheval N° 9. Cette coupe histologique intéressant un ganglion montre l'envahissement des sinus par des cellules volumineuses, de taille inégale, parfois en amas, comme cela se voit au centre du sinus le plus haut situé.

Figure 3 : Coupe N° 62.404 - C.R.A.C.M. - Cheval N° 10. L'examen se situe au niveau du péricarde et montre une embolie vasculaire alors que le vaisseau supérieur reste béant.

Figure 4 : Coupe N° 62.404 - C.R.A.C.M. - Cheval N° 10. Même coupe intéressant le myocarde avec des travées de cellules néoplasiques comportant les deux types cellulaires que nous avons décrits : cellules claires avec quelques fines granulations mélaniques qui sont des mélanocytes malins et de volumineuses cellules macrophagiques bourrées de gros pigment mélanique.


1


2


3

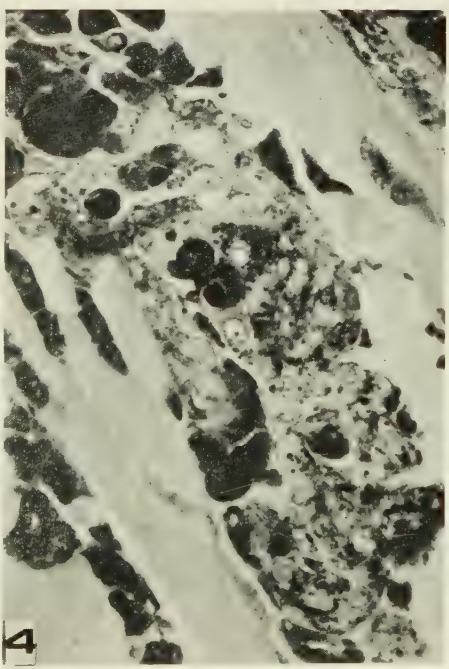

4

PLANCHE XXIII

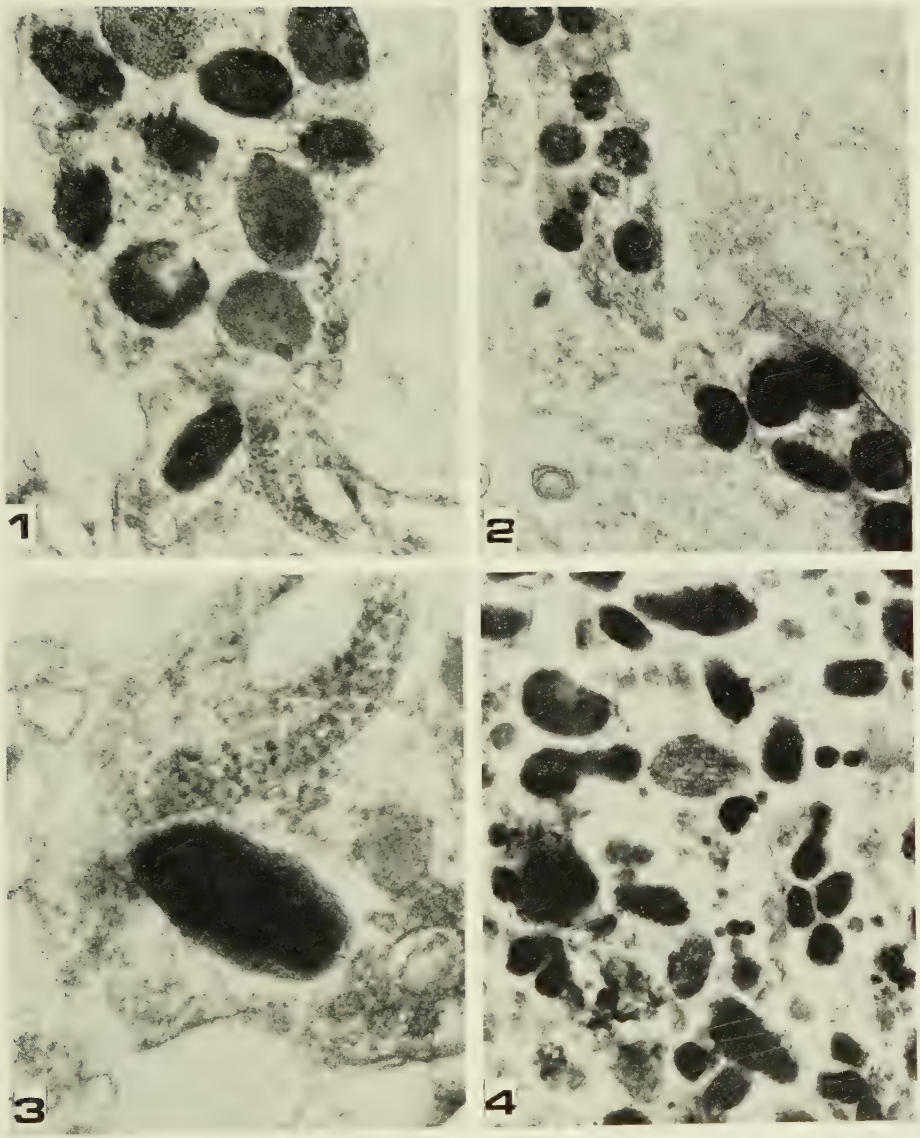
Ultrastructure du mélanome du cheval.

Figure 1 : Examen N° 10.216 - F.A.C. - X 80.000. Dans l'ergastoplasme d'une cellule mélanocytique, on trouve des mélanosomes à différents types de maturation, très dysplasiques : avec des aspects en « croissant » ou une absence de mélanine ; le support protéique seul ou bien simplement quelques fines granulations donnant l'aspect de mélanosome incomplet ou immature.

Figure 2 : Examen N° 10.218 - F.A.C. - X 50.000. Aspect de phagosomes dans un macrophage, à l'intérieur duquel on rencontre des mélanosomes dysplasiques.

Figure 3 : Examen N° 10.216 - F.A.C. - X 100.000. Aspect révélant à côté d'un mélanosome presque normal, au-dessus de lui, une structure protéique incomplète.

Figure 4 : Examen A. 480 - C.R.A.C.M. - X 50.000. Etude en ultrastructure d'un culot de centrifugation à 5.900 g, qui permet de discerner toute une série de mélanosomes dysplasiques avec toutes les structures possibles, depuis le support protéique seul jusqu'au mélanosome complet ou atypique, en « anneaux », en « croissant ».


1
2
3
4

perturbée : des mélanosomes en « cocarde » ou en « anneaux » ; d'autres ont un support protéique à peu près normal, mais un accrochage anormal de la mélanine, donnant des aspects « grisés » ou « piquetés » de mélanosomes immatures.

Toutes ces atypies sont caractéristiques des mélanomes malins. Ce sont des anomalies que l'on rencontre dans les mélanocytes où les mélanosomes sont répandus dans l'ensemble du cytoplasme, alors que dans les macrophages (Pl. XXIII, fig. 1 et 3) les mélanosomes sont groupés dans des sacs que sont les phagosomes, ce qui, au point de vue microscopie optique, représente les grains volumineux que l'on trouve dans les cellules (Pl. XXIII, fig. 4).

b) *Etude ultrastructurale sur culot de centrifugation des tumeurs :*

L'étude du culot de centrifugation des tumeurs, après éclatement des cellules, nous a donné des résultats intéressants. En effet, il nous a permis d'avoir une densité moindre d'éléments et de les dissocier en quelque sorte entre eux : les éléments matures et les éléments immatures (Pl. XXIII, fig. 4).

On peut voir ainsi des structures purement protéiques soit très régulières, soit au contraire à peine ébauchées et, d'autre part, des mélanosomes irréguliers, atypiques en « croissant », en « anneaux ». Ces mélanosomes, qui sont séparés de leur substrat, paraissent moins sensibles aux électrons et ont permis une étude plus fine.

En résumé, l'étude en microscopie électronique du mélanome du cheval permet de constater les mêmes anomalies de structure des mélanosomes que dans le mélanome malin de l'homme et par ailleurs de dissocier deux types de cellules : les mélanocytes malins d'une part et les macrophages d'autre part, qui peuvent être du reste des cellules de tous types (histiocytaires, réticulaires ou même conjonctives).

CHAPITRE II

Les données biologiques

Notre but était de donner le côté anatomo-pathologique des tumeurs mélaniques animales que nous avons eu à examiner. Cependant, le travail considérable de l'équipe mélanome se doit d'être rapporté, une partie relève du pathologiste (la culture de tissus pour la morphologie), les autres domaines sont ceux des chercheurs spécialisés en génétique, en biochimie et en immunologie. Quant aux isotopes, nous avons précisé l'aide du service de recherches isotopiques de l'Unité INSERM de Bordeaux du Pr. BLANQUET et de son collaborateur N. SAFI.

Nous donnerons donc les résultats de chacune des études faites, car elles sont indispensables pour l'étude synthétique.

— I —

LES DONNEES DE LA CULTURE DES MELANOMES

(123-124 et de 173 à 185)

C'est la culture de tissus qui a permis au départ d'assurer la vie des cellules reçues de MOORE du ROSEWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE de Buffalo. Il s'agissait de la lignée continue du mélanome spontané du hamster.

A. — LES TUMEURS ANIMALES EN CULTURE :

a) **Le mélanome Fortner M.M. # 2 Souche 87.341 R.P.M.I. :**

La souche « MOORE », quand elle est parvenue au laboratoire en novembre 1968, présentait de nombreux aspects dégénératifs. En cours de culture, on observait des cellules rondes souvent libres dans le milieu (Pl. XI, fig. 2 et 4). Ces cellules étaient petites, bien réfringentes, un pigment était nettement visible, mais sur les surnageants la recherche de la mélanine a été négative à plusieurs reprises.

Les lamelles fixées et colorées par la technique de HARRIS-SCHORR montraient, lors des premières subcultures, un pourcentage de cellules dégénératives élevé, avec une vacuolisation cytoplasmique et nucléaire (Pl. XI, fig. 2).

Un certain nombre de noyaux étaient pycnotiques. Les cellules contenaient un pigment cytoplasmique qui s'est révélé positif à la coloration de la mélanine, alors que d'autres cellules étaient dopa-positives (Pl. XII).

Au fur et à mesure des subcultures, le tapis cellulaire est devenu plus dense ; de nombreuses couches cellulaires superposés, avec des micro-colonies et un « crosing over » très net.

On observait deux types cellulaires, soit des cellules d'apparence épithéliale (mélanocytes) groupées en amas, à prolongements cytoplasmiques. Ces cellules sont richement mitotiques, soit des cellules fusiformes provenant probablement du stroma tumoral (Pl. XI, fig. 1 et 3). Il ne faut pas oublier que cette souche cellulaire provient d'une mise en culture d'une tumeur animale.

Au fil des subcultures, l'aspect chromique des cellules s'est atténué et a disparu. Les réactions argentaffines et tyrosinasiques se sont révélées négatives. En juillet 1971, la souche 87.341 en était à la 34e sub-culture.

b) La mise en culture des différents mélanomes " Fortner-Moore " transplantés :

La caractéristique des tumeurs spontanées transplantables de cette souche MOORE est son aptitude et sa facilité à être cultivée.

Au début, les subcultures furent poursuivies longtemps. Mais le service fut rapidement submergé par l'abondance des tumeurs mises en culture (Tableaux VI, VII et VIII) ; aussi, dès la deuxième subculture, les cellules étaient mises en réserve dans l'azote liquide.

Au point de vue cytologique, ces cultures sont restées très semblables à elles-mêmes dans la première série et dans la troisième série.

En ce qui concerne la deuxième série, les cultures ont montré, au début, des lésions cytopathogènes avec vacuolisations nucléaires ; pour un assez grand nombre du reste, la microscopie électronique a mis en évidence du P.P.L.O. ou un gros virus.

La morphologie était assez différente avec des aspects épithélioïdes plus marqués que précédemment.

Il faut noter que, jusqu'en 1971, les milieux employés furent les milieux habituellement utilisés pour les tumeurs du virus Polyome.

L'utilisation du milieu de MAC COY et une plus grande richesse en tyrosine faciliteraient l'entretien et le départ des cellules mélaniques et surtout la conservation du pigment et de sa sécrétion.

Nous pensons que la perte du pigment mélanique de notre souche 87.341 de MOORE est probablement due à la culture des cellules n'ayant plus leur support de kératinocytes.

c) Le mélanome chimio-induit par le D.M.B.A. du hamster :

Jusqu'à ce jour, les essais de culture de cette tumeur sont restés sans succès. On obtient des cellules en survie et il n'y a pas de subculture possible avec les techniques qui ont été employées jusqu'à présent.

Il faut donc reprendre les procédés de mise en culture, en particulier supprimer la trypsination, faire des explants et utiliser des milieux plus riches en tyrosine.

Mais ce qui est certainement à la base des échecs actuels, c'est l'importance des mélanophages dans la tumeur qui sont des cellules intoxiquées, donc incapables de se multiplier et qu'il faudrait dissocier des mélanocytes qui sont en bien moins grand nombre.

Il est du reste certain que les mélanophages, incapables de se reproduire en raison de leur surcharge pigmentaire, se désintègrent rapidement dans le milieu de culture, le rendant impropre à la multiplication des mélanocytes.

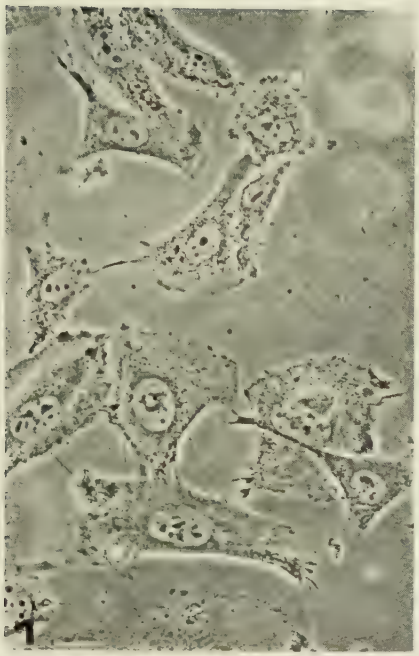
Du reste, LEJEUNE (101), dans son magnifique travail « in vivo » et « in vitro » sur les mélanophages, a bien montré cette différence.

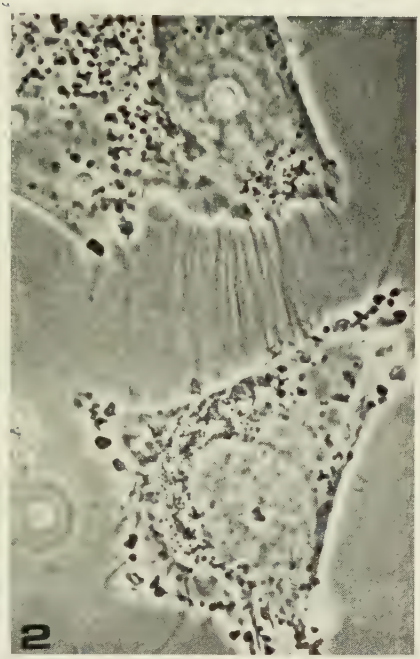
Le mélanocyte est bien reconnaissable en ultrastructure. Il a une activité tyrosinasique alors que le mélanophage, avec ses phagosomes, présente une activité phosphatase acide positive.

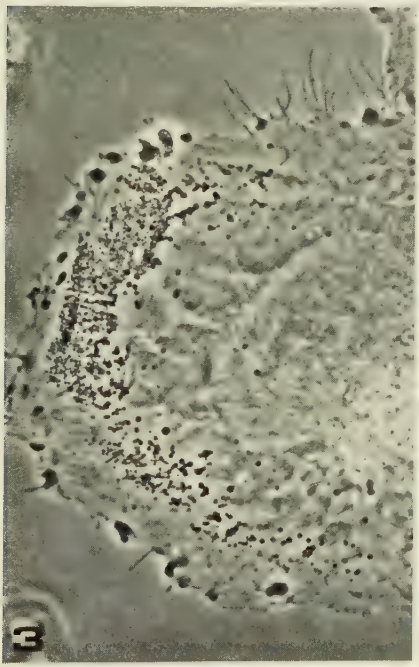
PLANCHE XXIV

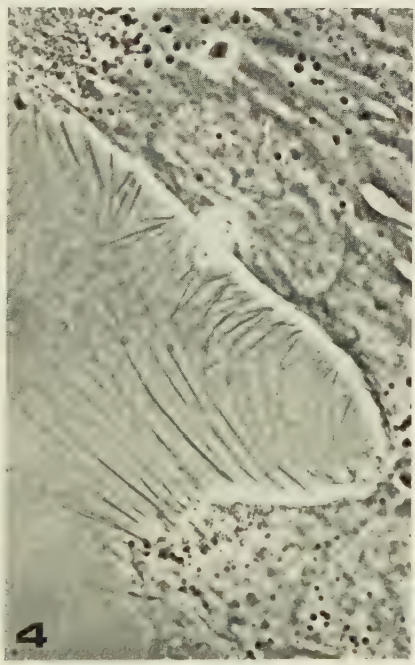
Culture de tissus d'une souche de mélanome humain en lignée continue. JOHNSON R.P.M.I. 5.966. Cette souche en provenance du ROSEWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE a été transmise par KOURILSKY.

Les cellules sont triangulaires ou pentagonales (figure 1). En contraste de phase, elles présentent de nombreuses inclusions « noires » (figure 3) qui ne sont pas de la mélanine comme le démontre l'ultrastructure. A noter la présence de prolongements « épineux » (figures 2 et 4).


1


2


3


4

Seuls les mélanocytes, qui survivent dans les cultures, seront capables de reproduire une tumeur chez l'animal. Par contre, les histiocytes que sont les mélanophages ont une avidité très grande pour le pigment mélanique et n'ont aucun pouvoir tumorigène.

d) La tumeur mélanique du cheval :

Elle présente les mêmes caractéristiques que le mélanome chimio-induit du hamster et les mêmes difficultés culturales en raison de l'abondance des mélanophages. En résolvant la question du mélanome chimio-induit, on trouvera du même coup la solution pour le mélanome équin.

B. — LES MELANOMES HUMAINS EN CULTURE :

a) Mise en culture des tumeurs mélaniques humaines :

Les études expérimentales animales n'ont cependant jamais fait perdre de vue la pathologie humaine.

Chaque fois qu'un malade est atteint de mélanome ou de tumeur préjugée comme telle, une mise en culture est faite.

Mais jusqu'à ces derniers temps, ce travail s'est avéré difficile et les réussites furent assez rares. Jamais de lignée continue ne fut obtenue dans le Laboratoire.

Les meilleurs résultats furent ceux de culture de mélanomes métastatiques pleuraux avec épanchements abondants.

Ces tout derniers mois par contre, avec les nouveaux milieux, on obtient des subcultures qui permettent une étude cytologique, immunologique et caryotypique.

b) Les lignées continues de mélanomes humains :

A l'occasion de la réunion de la section immunologie du Groupe Mélanome de l'E.O.R.T.C. à Marseille les 6 et 7 septembre 1971, les services de recherches du C.R.A.C.M. s'est vu confier les différentes souches de mélanomes humains, actuellement connues dans le monde.

Nous avons donné, dans le chapitre du matériel à notre disposition, la nomenclature de ces différentes souches.

La description a été faite, pour la souche JOHNSON R.P.M.I. 5.966, qui pousse sur verre, par TOSHIMA et MOORE (123) et, pour la souche S.K. Mel 1 ou SALTMAN, par OETTGEN (124).

Nous donnons sur la planche XXIV l'aspect de la souche JOHNSON qui nous a été transmise, au laboratoire, par KOURILSKY.

Cette souche, qui pousse en monocouche sur verre, est très floride, avec le milieu suivant :

â â { M.E.M. + 10 % de sérum fœtal de veau
R.P.M.I. 1640 + 10 % de sérum fœtal de veau

avec les antibiotiques habituels.

La multiplication est très rapide, le nombre de cellules ensemencées est multiplié par 12 en dix jours.

Les cellules sont triangulaires, quadrangulaires. Les côtés des cellules sont toujours à angles aigus.

Des inclusions noires au microscope en contraste de phase, assez volumineuses, doivent être précisées quant à leur nature exacte.

Mais l'une de ses caractéristiques est l'abondance de ses prolongements à type de spicules ou de cils (Pl. XXIV, fig. 2 et 4).

C. — ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES CULTURES (Pl. XXV et XXVI) :

La microscopie électronique des cultures de la souche MOORE 87.34[1] n'a pas apporté d'éléments importants à la connaissance de cette cellule par rapport à l'étude des tumeurs qu'elle provoque.

Cependant, c'est l'ultrastructure qui, pour la deuxième série du mélanome MOORE, a attiré l'attention sur la surinfection par du P.P.L.O. et a amené les recherches immunologiques dont nous relaterons plus loin les découvertes.

En toute dernière heure, l'étude au microscope électronique de la souche JOHNSON a montré une absence complète de mélanosomes simples et complexes.

Les aspects en contraste de phase pouvaient en imposer pour de la mélanine, ce qui était faux. Les prolongements cytoplasmiques ont une structure tubulaire avec des micro-tubules, comme cela se voit dans les formations ciliaires. Aussi cette souche humaine en culture finit par se rapprocher étrangement de la souche MOORE 87.341.

*
* *

L'utilité de ces différentes souches de mélanomes humains en lignée continue n'est plus à démontrer. C'est avec elles que peuvent se faire les travaux d'approche immunologiques en particulier, dont les applications aux tumeurs humaines ensuite seront possibles.

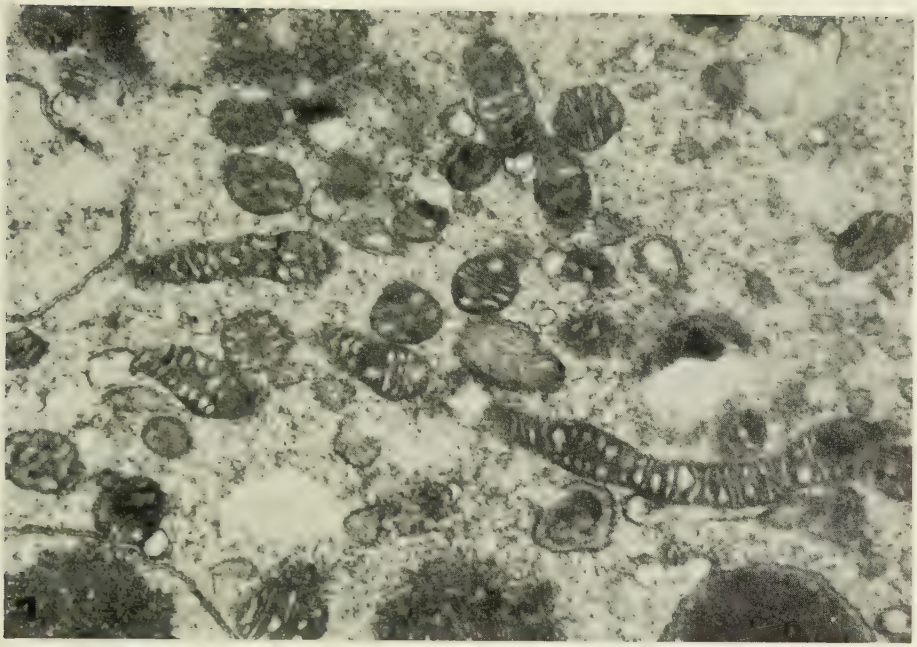
Mais il faudra tenir compte de la dédifférenciation au cours des cultures.

PLANCHE XXV

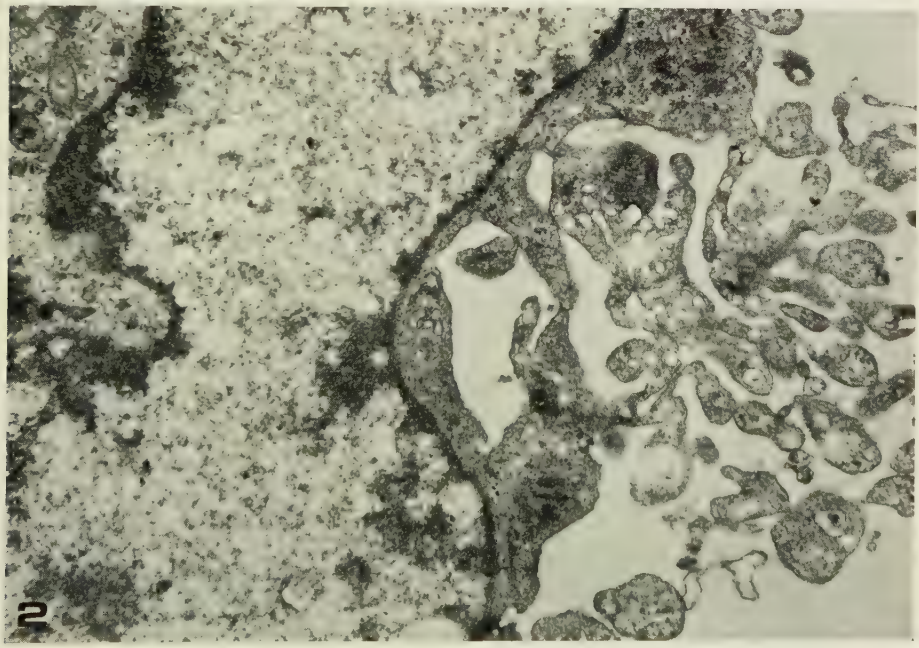
Ultrastructure d'une culture de tumeur du mélanome FORTNER-MOORE 3e série (hamster 5.106) (ME 2.577).

Figure 1 : Zone de cytoplasme qui révèle l'abondance mitochondriale de cette cellule tumorale. Ces mitochondries sont très atypiques et souvent dégénératives.

Figure 2 : Le noyau fortement encoché de la même cellule. A noter les nombreuses micro-villosités qui sont en culture, une des caractéristiques des mélanocytes.



1



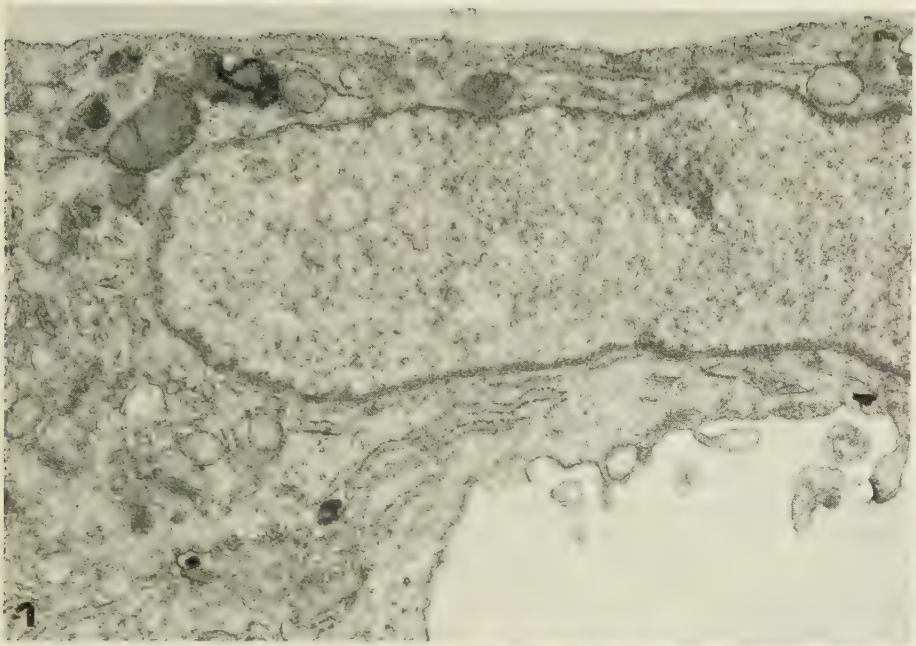
2

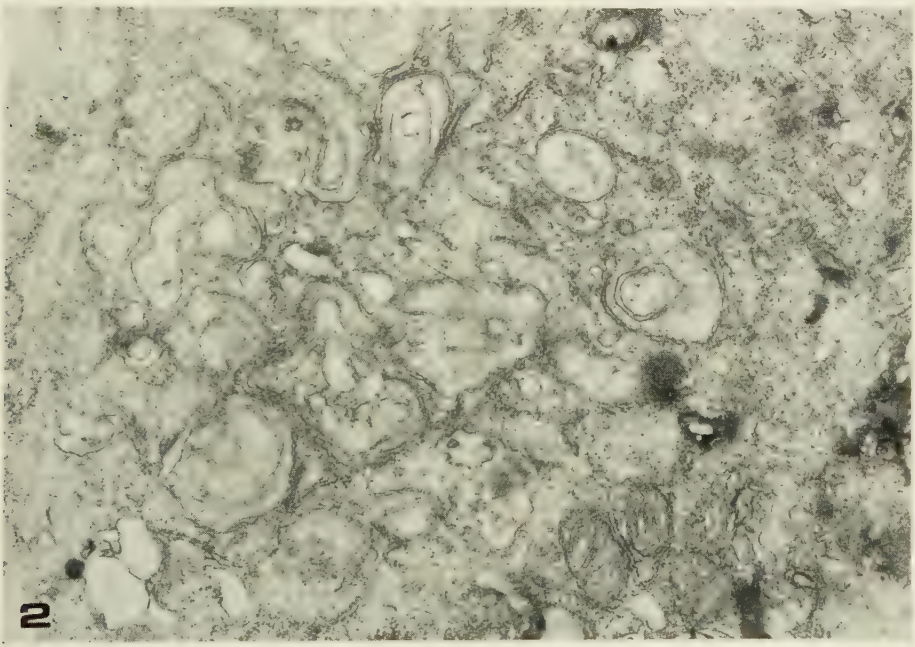
PLANCHE XXVI

Ultrastructure d'une culture de tumeur du mélanome FORTNER-MOORE, 3e série (hamster 4.917) (ME 2.339).

Figure 1 : Une cellule mélanocytaire maligne absolument semblable à celles de la première série. Dans la zone golgienne et proche d'elle, les mêmes organites sombres, mais là encore sans structure de mélanosomes.

Figure 2 : Une zone cytoplasmique d'une cellule de la même culture, montrant de nombreux aspects dégénératifs. De tels aspects sont fréquents dans les primo-cultures où un grand nombre de cellules restent uniquement en survie avant de mourir. C'est un aspect « pré-agonique ».


1


2

— II —

LES DONNEES DE LA GENETIQUE

(186-193)

Nous devons à la section de génétique du laboratoire dans lequel travaillent R. FAVRE et Monique BEREBBI les résultats que nous allons donner.

Seules les tumeurs de FORTNER-MOORE ont été étudiées. En effet, pour les tumeurs chimio-induites et pour le mélanome du cheval, les difficultés de culture et de dissociation des mélanocytes des mélanophages rendent actuellement très aléatoire leur étude caryotypique.

Rappelons que l'origine de la tumeur amélanotique du hamster doré est un mélanome spontané obtenu dans le laboratoire de FORTNER au Sloan Kettering Institute, le 8 octobre 1958, et que son caryotype a été décrit par ISHIHARA, MOORE et SANDBERG (192) en 1962.

Cette tumeur présentait à l'époque une distribution chromosomique des cellules se situant près de l'hypotriploïdie (Mode S = 60-61).

Les auteurs avaient décrit un certain nombre de chromosomes marqueurs qu'ils désignaient :

— M1 M2 M3 M4 M5.

A. — ETUDE DU CARYOTYPE DE LA SOUCHE 87.341 MOORE :

Cette étude a été faite en 1969. A son arrivée à Marseille, dans le laboratoire, Monique BEREBBI, qui avait étudié antérieurement les tumeurs viro-induites chez le hamster doré (125), a fait le caryotype de la souche 87.341 envoyée par MOORE.

a) *L'histogramme* (sept ans après l'étude de ISHIHARA) présente :

— une population proche de la diploïdie à 40-41 chromosomes, proche du caryotype normal du hamster (44 chromosomes) ;

— une population près de la tétraploïdie avec un pic à 80-82 chromosomes ;

— entre ces deux populations cellulaires, nous avons retrouvé un certain nombre de cellules présentant un caryotype proche de la triploïdie (58-62 chromosomes).

b) *Les chromosomes marqueurs :*

L'analyse détaillée de 50 mitoses environ a permis de retrouver certains marqueurs décrits par ISHIHARA, MOORE et SANDBERG.

Le marqueur M1 en particulier se retrouve dans 80 % des cellules analysées. C'est un chromosome médian supérieur à la taille du chromosome X.

Les chromosomes M4 subtélocentriques et M5 télocentriques se retrouvent, mais avec une fréquence beaucoup plus faible (10 % environ).

Ainsi la souche FORTNER # 2 souche MOORE 87.341, 7 ans après sa mise en culture, a subi « in vitro » certaines modifications et évolue vers une hétérogénéité chromosomique, mais un certain nombre de marqueurs persistent.

On doit noter également que le sexe caryotypique de la souche est toujours le même XX.

B. — ETUDE DU CARYOTYPE DES TUMEURS MELANIQUES TRANSPLANTEES DU HAMSTER :

En 1971, il était intéressant de voir ce qu'était devenu l'aspect caryotypique de la souche MOORE après transplantation sur nos hamsters. Nous devons cette étude à R. FAVRE.

a) **Caryotype du mélanome « FORTNER-MOORE » 3^{me} série :**

La tumeur de deux hamsters a été vue :

— *Le hamster 5.145,* qui provenait de la transplantation de la tumeur du hamster femelle 5.105. Cette transplantation correspondait au 5^{e} passage de la souche dans cette 3^{e} série.

— *Le hamster 5.222* provenant du passage du hamster précédent (5.145), 6^{e} passage de la souche dans la 3^{e} série.

1) *Hamster 5.145* (Pl. XXVII) :

Soixante-treize mitoses tumorales ont été photographieés. Une mitose appartenait à l'animal récepteur du sexe féminin 44, XX.

* L'histogramme montre un *nombre modal* compris entre 60 et 70, c'est-à-dire très près de la triploïdie.

* La recherche des *chromosomes marqueurs* a révélé un grand chromosome télocentrique dans 64 mitoses de façon certaine (88 %). Mais sur les 9 mitoses sans chromosomes marqueurs, il y avait 4 mitoses à 51 chromosomes (perte chromosomique probable) et 5 mitoses à plus de 110 chromosomes d'exploitation qualitative difficile.

On peut donc dire que dans les mitoses à nombre modal 64-67, il y a un chromosome marqueur M1 dans 95,5 % des cas. 9 métaphases ont été agrandies et classées : toutes portent le grand chromosome télocentrique M1.

Deux mitoses portent en plus un autre chromosome marqueur subtélocentrique M2 (nombre modal 64).

Sur 4 mitoses de nombre modal 65 on trouve :

— deux mitoses à 2 marqueurs M1,

— une mitose à 4 marqueurs 2 M1 et 2 M2,

— une mitose à un seul marqueur M1.

PLANCHE XXVII

Etude caryologique du hamster 5.145, présentant une tumeur FORTNER-MOORE, 3e série (3e passage de la souche).

Figure 1 : Un caryotype à 64 chromosomes, très proche de la triploïdie. On relève la présence de 2 marqueurs M 1 et M 2, semblables à ceux trouvés en 1966 par ISHIHARA et MOORE.

Figures 2 et 3 : Des mitoses de nombre modal similaire avec le marqueur M 1 qui est pratiquement constant.

Figure 4 : Une dysplasie chromosomiale « en anneaux », « enlacés ». Cette image est superposable à celle que montrent les auteurs du ROSEWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE d'où provient la souche dite « MOORE 87.341 ».

1
2
3
4

Une mitose de nombre modal 67 avec deux marqueurs M1 et M2.
Une mitose à 68 chromosomes avec 1 marqueur.
Une mitose à 70 chromosomes avec 1 marqueur.

* *Les remaniements chromosomiques* (Pl. XXVII, fig. 4) :

Ils paraissent nombreux, montrant un certain aspect dynamique de cette tumeur :

— chromosomes marqueurs constants et inconstants
— cassure chromatinienne
— endoréduplication sélective
— anneaux enlacés.

Cette dernière malformation est exactement la même que MOORE et ses collaborateurs montrent dans leur planche 60 (192).

Un deuxième marqueur se retrouve assez souvent sur les petites photographies sans pouvoir l'affirmer.

2) *Hamster 5.222 :*

Quatre-vingt treize mitoses tumorales ont été photographiées. On retrouve un « chromosome marqueur » M1 dans 51 mitoses de façon certaine (55 %) et dans 13 mitoses de façon probable, soit en tout 68 %.

Dix-neuf mitoses ne contenaient pas ce marqueur pour la plupart de nombre modal entre 60 et 70.

L'étude des métaphases agrandies et classées révèle des chromosomes marqueurs semblables à ceux rencontrés dans le hamster 5.145.

Les remaniements chromosomiques sont moins variés que pour le passage précédent, mais 12 mitoses (13 %) présentent un chromosome dicentrique.

b) **Caryotype du mélanome « FORTNER-MOORE » 2^{me} série :**

La deuxième série ayant présenté une transformation morphologique par rapport au mélanome FORTNER-MOORE de la 1re série et de la 3^{e} série, il était particulièrement intéressant de voir les modifications génétiques possibles.

Le caryotype a été fait sur la tumeur du *hamster 5.574* qui correspond au 18^{e} passage de la 2^{e} série du mélanome FORTNER-MOORE.

L'histogramme a porté sur 81 mitoses tumorales qui ont été photographiées.

* Le nombre modal est compris entre 60 et 70 chromosomes.

* Les « chromosomes marqueurs » existent toujours ; le grand télocentrique M1 est présent dans 74 mitoses (91 %) de façon certaines et dans 5 mitoses de façon probable (soit en tout 95 %).

Deux mitoses ne contiennent pas de chromosomes marqueurs. Il n'y a que 52 et 51 chromosomes pour ces mitoses, pour lesquelles une perte chromosomique s'est produite.

* *Les remaniements chromosomiques* sont présents comme le prouve la présence de 12 chromosomes dicentriques et dans une mitose, une image triradiale.

EN RESUME, l'étude des tumeurs du mélanome « FORTNER-MOORE » présente, douze ans après sa mise en culture et les innombrables transplantations sur l'animal, un nombre modal relativement constant compris entre 60 et 70 chromosomes.

Les marqueurs que l'équipe du Rosewell Park Memorial Institute de Buffalo, dans leur étude « princeps » sur cette tumeur expérimentale, avait décrits ont été retrouvés par les généticiens du service : en particulier un chromosome marqueur quasi constant et des remaniements chromosomiques parfois originaux (Pl. XXVII, fig. 4).

Il semblerait exister une certaine différence avec la souche en culture où les cellules à nombre modal entre 60 et 70 formnt une population moins importante. Nous pensons que ce sont justement ces cellules qui, au cours des transplantations, sont celles qui ont le potentiel tumoral le plus élevé et qui semblent le mieux adaptées à l'animal.

Les mitoses très atypiques à nombre modal élevé ou très intermédiaire n'ont pas une potentialité reproductive très valable.

Enfin, c'est un fait particulièrement notable, le caryotype de la 2^{e} série reste semblable aux autres séries alors que les inflexions morphologiques ont varié.

— III —

LES DONNEES DE LA BIOCHIMIE

(78 - 126 à 131)

Le département de biochimie du Service de Recherche participe pour une grande part à l'équipe mélanome.

J.-P. KLEISBAUER recherche les constituants de la protéïne de soutien du mélanosome et R. POIRIER s'occupe des réactions immuno-chimiques des tumeurs expérimentales et humaines. Nous leur devons cette étude.

Nous allons exposer les résultats actuels de leurs deux années de travaux.

A. — ETUDE BIOCHIMIQUE DU MELANOME DU HAMSTER " FORTNER-MOORE " :

Etude immunochimique des protéïnes solubles extraites du mélanome " Fortner-Moore " (127) :

a) **Extraction des protéines solubles :**

Une vérification à l'aide de la microscopie électronique a été faite pour contrôler la présence des divers éléments. Quel que soit le tampon utilisé, les noyaux précipitent à 1.085 g, les mitochondries et les mélanosomes lorsqu'ils existent, comme c'est le cas dans le mélanome du cheval, sont retrouvés dans le culot à 5.900 g. Le solvant choisi a été le NaCl 9 g % et nous avons centrifugé le broyat à 3.000 g, puis à 9.750 g, pour éliminer les noyaux et les mitochondries.

b) **Etude du surnageant :**

— Les techniques enzymatiques courantes permettent de montrer que le surnageant est riche en transaminases oxalo-acétiques (230 U king), en phosphatases alcalines (66 U king Armstrong) et en β glucuronidase (755 gamma). Le surnageant est pauvre en phosphatases acides (1 U king Armstrong), en transaminase pyruvique (0,8 U king) et en G 6 PDH (1 mU).

— Les dosages des métaux ont permis de voir que le surnageant était riche en cuivre (245 gamma) et dépourvu de fer. Les résultats sont exprimés pour un gramme de protéïne.

— L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en l'absence de S.D.S. montre la présence d'une bande prédominante qui migre avec un Rf voisin de 0,9. Cette bande est colorée par la p phénylène diamine dans les cas de tumeurs conservées au congélateur pendant plus de trois mois.

La filtration sur séphadex G. 100 permet d'obtenir trois pics dont le dernier est coloré et contient cette protéïne de Ff 0,9 en électrophorèse en gel de polyacrylamide à 7,5 %. Cette protéïne est mélangée à des acides nucléïques et son maximum d'absorption est de 276 m .

c) **Etude des protéines obtenues par relargage :**

Les précipités à 40 et 50 % de saturation (Me 40 et Me 50) contiennent cette protéine de migration rapide en électrophorèse en gel de polyacrylamide. Elle possède les mêmes propriétés de coloration que la protéïne du surnageant.

* Critères de solubilité : cette protéïne est soluble dans des solvants dont le pH est supérieur à 5 et peu soluble dans les solvants dont le pH est compris entre 3 et 5, elle est d'ailleurs dénaturée par les solvants acides.

— L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de S.D.S. montre que cette protéïne est hétérogène car il existe 12 bandes visibles par la coloration au bleu de coomassie.

— La précipitation par l'acétone employée pour isoler la tyrosinase liée au R.N.A., selon la technique de CHIAN et WILGRANM (131) qui associe à 100 mg de Me 4 dilués0 dans du bicarbonate d'ammonium ¯0,1 volume de sulfate d'ammonium saturé et 1,1 volume d'acétone, montre que le précipité obtenu contient la protéïne recherchée alors que le surnageant ne la possède pas.

La filtration sur séphadex G. 100 permet d'isoler deux pics dont le retardé contient cette protéïne qui a un maximum d'absorption de 280 m , cette protéïne n'est pas pure puisque l'électrophorèse en gel de polyacrylamide sans S.D.S. montre qu'il existe deux à trois bandes dont une donne la coloration par la p phénylène diamine.

La précipitation en gélose permet de mettre en évidence deux composantes antigéniques distinctes : la plus importante migre peu autour du trou de départ comme le fait la ceruloplasmine. La moins importante migre du côté des gamma globulines. Il est possible que ces protéïnes soient voisines des protéïnes sanguines circulantes du hamster, car notre antisérum révèle les ceruloplasmines circulantes. Elles sont aussi absorbées par du sérum de hamster.

Les immuns sérums anti Me 40 et anti Me 50 révèlent les mêmes types de protéïnes après inter-action avec les extraits du type Me 40 ou Me 50. Suivant ces critères, ces protéïnes sont identiques, car pouvant être réciproquement absorbées. Dans les deux cas, nous obtenons deux arcs de précipitation dont l'un se trouve près du trou de départ, l'autre au niveau des γ globulines. Ces deux arcs de précipitation ne sont pas spécifiques des protéïnes tumorales ; en effet, d'une part, le sérum anti γ globulines de l'Institut Pasteur de Paris permet de révéler la protéine qui précipite du côté des γ globulines sans révéler toutefois l'autre protéine. L'anti-sérum inversement révèle deux arcs de précipitation en présence de hamster normal. Enfin, l'absorption de l'anti-sérum par des protéines sériques normales de hamster supprime tous les traits de précipitation contre les protéines tumorales.

Ils ont pu démontrer, grâce à ces anti-sérums, qu'il existait une immunofluorescence cytoplasmique en présence de cellules de la souche MOORE.

EN RESUME :

La méthode de purification proposée : extraction en présence de chlorure de sodium, élimination des cellules, noyaux et mitochondries, par centrifugation à 9.750 g ; relargage par le sulfate d'ammonium entre 30 et 50 % de saturation ; filtration sur séphadex G. 100, permet d'isoler un groupe de protéïnes dont une est prédominante, révélée par leur anti-sérum.

Nos travaux sont différents de ceux de POMERANTZ (128) qui, dans le cas d'une tumeur chromique de hamster, avait mis en évidence deux tyrosinases. Les tyrosinases existent sous plusieurs formes et peuvent être extraites de tissu aussi varié que les champignons, mais aussi de tumeurs mélaniques de souris (129) ou humaines (130).

Nous verrons l'importance des résultats du département de biochimie sur la tumeur transplantable du hamster et sur les données pathogéniques que l'on peut envisager à leur lumière.

B. — ETUDE BIOCHIMIQUE DE LA TUMEUR MELANIQUE DU CHEVAL (78) :

Les travaux de J.-P. KLEISBAUER sur le mélanome équin n'ont été que partiellement mentionnés dans une publication sous presse. Ils portent à l'heure actuelle uniquement sur la biochimie, car pour l'immunochimie R. POIRIER n'a pas encore les anti-sérums nécessaires.

Les techniques sont celles utilisées pour le mélanome achromique du hamster.

La masse tumorale, qui est ici particulièrement abondante, est broyée, centrifugée à 1.085 g, 5.900 g, 9.750 g. Les différents culots sont fixés et examinés en microscopie électronique (Pl. XXIII, fig. 4).

Le surnageant permet l'étude des activités enzymatiques : β glucuronidase selon la technique de TALAWAY (196) et tyrosinase selon la technique de BURNETT (129-130) (Pl. XXVIII).

PLANCHE XXVIII

Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 5 % en acrylamide d'un extrait de tumeur mélanique du cheval. La coloration spécifique de la tyrosinase se fait par la DOPA.

1) Chromatographie sur D.E.A.E. Séphadex :

La chromatographie sur échangeur d'ions du type D.E.A.E. séphadex permet d'isoler un certain nombre de pics différents.

Avec le précipité cheval à 70 %, on a obtenu plusieurs pics d'élution. Le premier non fixé est élué par du tampon phosphaté 0,1 M pH 6,8. Les autres sont élués par un gradian discontinu de tampon phosphaté pH 7,4 de 0,1, 0,2, 0,3 et 0,6 M.

Le premier pic non fixé contient des protéïnes D.O.P.A. positive. Il existe trois bandes migrant moyennement en électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5 %.

2) Les activités enzymatiques :

A titre d'exemple, nous donnons ici les résultats de l'observation du cheval X :

— Phosphates alcalines 10 U/mgr protéïnes
— Transaminases 50 U K
— β glucuronidases 28 U I

Si l'on utilise des surnageants de densité variable, selon la centrifugation (5.000, 7.000, 9.000, 11.000, 15.000 et 18.000 g), on note un accroissement de l'activité β glucuronidase en augmentant la centrifugation.

EN RESUME :

Les β glucuronidases sont élevées dans le mélanome du cheval, moins importantes que pour l'homme et sensiblement identiques à celles du hamster.

Les tyrosinases extraites des mélanomes du cheval se comportent comme les tyrosinases humaines, végétales et animales. Elles se comportent en électrophorèse de la même façon quelle que soit la tumeur équine et quel que soit le cheval portant la tumeur.

On doit noter la présence de tyrosinase et de β glucuronidases dans les localisations multiples à distance de la tumeur initiale et c'est là un point impuortant à retenir pour le rôle des histiocytes mélanophages.

— IV —

LES DONNEES DES ISOTOPES : IODOQUINE I^{131} ET I^{125}

Ce sont les résultats d'un travail à peine ébauché que nous donnons. Pour le marquage isotopique des mélanomes, les travaux ont jusqu'à ce jour été faits uniquement ou presque chez l'homme.

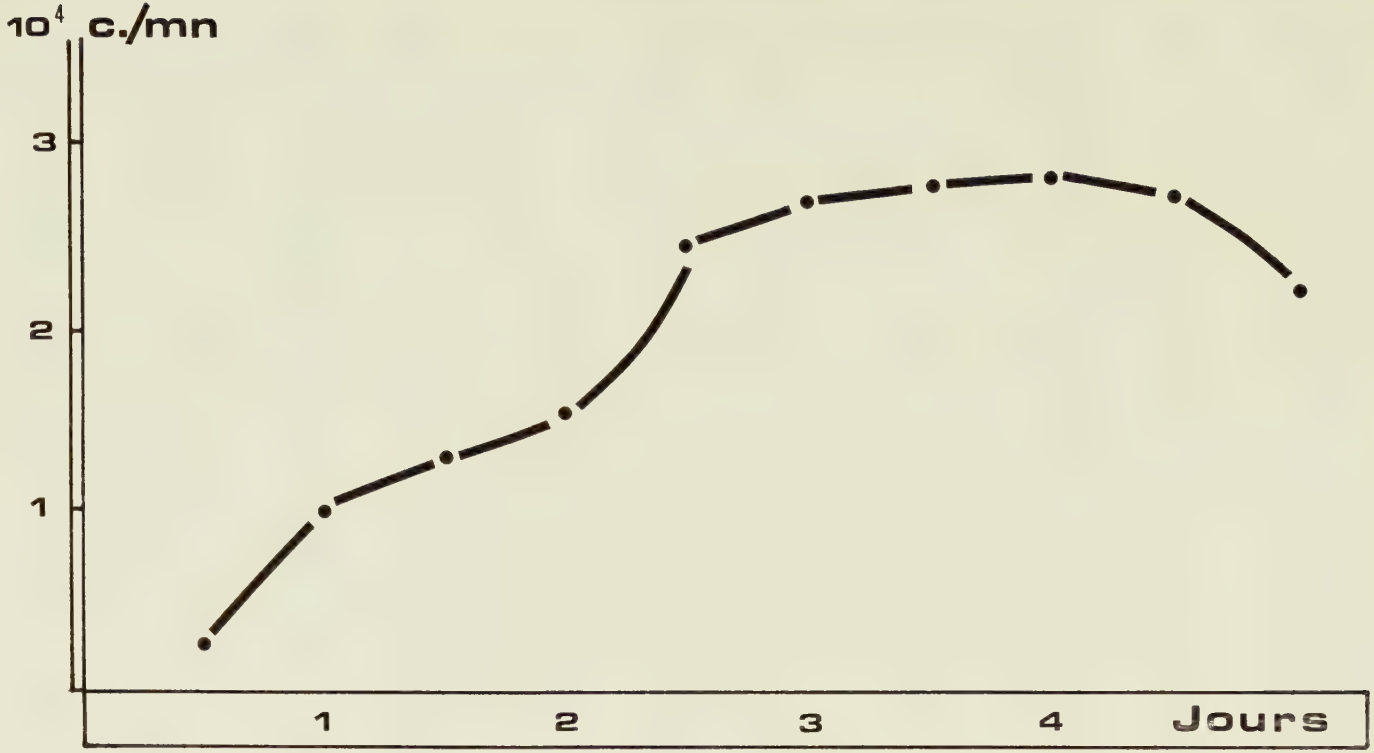
La spécificité, que paraît avoir l'IODOQUINE I^{131} et I^{125} pour le mélanome, nous a incité à mettre à l'épreuve cette technique sur un mélanome dont on a souvent discuté dans le laboratoire, la nature mélanique.

Les premiers résultats paraissent en faveur de ceux qui pensent à une tumeur « amelanotic ».

La courbe de fixation (Pl. XXIX) d'un hamster, porteur d'une tumeur « FORTNER-MOORE », est élevée, comme cela se voit dans les mélanomes chromiques ou achromiques humains.

En contre-partie, nous avions envoyé à SAFI, en aveugle, un hamster porteur de tumeur viro-induite par le Polyome et un hamster porteur d'un mélanome « FORTNER-MOORE ». Malheureusement, si le hamster porteur de mélanome a bien eu une courbe positive, par contre le hamster portant la tumeur Polyome est mort avant que l'examen ait pu être fait.

Ce sont des résultats tout à fait partiels et donc sans valeur statistique, mais ils sont une indication à poursuivre cette étude.



Fixation de l'Iodoquine I^{125} chez le hamster porteur du mélanome spontané FORTNER-MOORE. Normalement, après une élévation du taux de l'isotope au cours du premier jour, l'élimination est telle que le taux retombe en 24 heures à zéro. Dans le cas de notre hamster, la fixation a été très forte et la rétention s'est poursuivie au-delà du 4me jour.

— V —

LES DONNEES IMMUNOLOGIQUES

Les étapes de la transformation maligne et les événements qui se passent au niveau de la cellule (noyaux et membrane) représentent la préoccupation majeune de l'équipe immunologique du Laboratoire dirigé par G. MEYER. L'ensemble des travaux de ces sept dernières années, dans le système virus polyome hamster, viennent de paraître in « Advance in Cancer Research » (199).

Depuis deux ans, toute cette équipe a entrepris, soit dans le cadre O.M.S., soit dans celui de l'E.O.R.T.C., l'application aux mélanomes expérimentaux et humains, de toutes les techniques mises au point. Il était utile de voir dans un système expérimental différent si les données de l'oncologie virale se recoupaient avec celles d'un autre système expérimental.

Pour donner à ces premiers résultats toute leur valeur, il est indispensable de connaître les critiques dont sont justiciables les techniques mises en œuvre.

Nous envisagerons ensuite les données des mélanomes animaux qui sont à la base des recherches sur les mélanomes humains à l'heure actuelle.

A) CRITIQUES DES TECHNIQUES UTILISEES :

a) *La détection de l'antigène cytoplasmique* ne prête pas beaucoup à discussion et c'est une méthode au contrôle fidèle et facile.

b) **L'antigène de membrane** que A.-M. LHERISSON-STRABONI et G. MEYER ont trouvé de façon constante sur les cellules transformées par le virus Polyome (200), est beaucoup plus difficile à mettre en évidence dans les cellules mélanocytaires malignes.

Ces antigènes de membrane ont pu être retrouvés dans les systèmes expérimentaux, mais leur spécificité et leur modulation, de même que leur signification est encore l'objet de très nombreuses discussions.

En effet, si pour l'équipe anglaise du Chester Beaty, cet antigène de membrane a une spécificité très étroite de tumeurs et d'individus, pour l'équipe américaine de Seattle et de Bethesda, cet antigène présente des réactions croisées entre tous les mélanomes humains, M. LEWIS (153-155), HELLSTROM et HELLSTROM (201), MORTON (147).

L'attitude de RUMKE (154) à Amsterdam et de NAGEL (164) à Bâle est plus nuancée. Ces deux auteurs pensent qu'il existe certains cas de mélanomes à réaction croisée et d'autres spécifiques d'hôte.

Pour J.-P. CESARINI (communication personnelle), les différentes équipes pourraient avoir étudié des mélanomes de type différent, l'un viro-induit sur la côte Pacifique des Etats-Unis à antigénicité croisée, l'autre chimio ou physico-induit dans l'atmosphère de la banlieue londonienne à spécificité individuelle rigoureuse.

Il semblerait d'ailleurs que ce dernier auteur ait pu détecter certaines différences ultrastructurales entre ces différents types de mélanomes.

c) **Les réactions hôte-tumeur :**

Après avoir vu la valeur des moyens d'étude des différents antigènes actuellement connus, présents sur la cellule mélanique, nous examinons celle des moyens d'étude de la réaction de l'hôte vis-à-vis de la tumeur mélanique maligne.

1) La réaction sérique :

Que ce soit dans le système humain ou dans les systèmes expérimentaux, on peut mettre en évidence un certain nombre d'anticorps circulants. Ces anticorps sont :

* du type précipitant ainsi que l'a montré R. POIRIER dans des travaux non publiés.

En boîte d'Ouchterlony et contre des cellules mélaniques lyophilisées, on peut observer 2 à 3 arcs de précipitation dont l'un d'eux semble au moins spécifique et correspond probablement à l'antigène cytoplasmique.

J.-P. KLEISBAUER, R. POIRIER et G. MEYER (126-127) ont montré par immuno-électrophorèse en gel de polyacrylamide que cet anticorps révélait un corps proche d'une tyrosinase et probalement un iso-enzyme de cet enzyme.

* les anticorps révélés par immunofluorescence.

Ces anticorps sont dirigés soit contre un antigène cytoplasmique, soit contre un antigène de membrane. Ils ne semblent exister ou être exprimés que chez les malades ayant eu une régression spontanée tumorale ou ayant été traités par des cellules tumorales autologues irradiées (LEWIS, 153-155).

Nous avons vu à propos des antigéniques ce que l'on pourrait attendre de la spécificité de ces anticorps.

* des anticorps cytotoxiques ont pu être mis en évidence. Ces anticorps sont du type 7 S et nécessitent, pour pouvoir être actifs, la présence de complément et en particulier de la fraction C'3.

2) La réaction cellulaire :

Elle semble être la seule vraiment efficace dans la lutte immunologique de l'hôte contre la tumeur.

Nous avons vu comment la mettre en évidence par les tests de lymphotoxicité.

Ces tests paraissent dans des conditions strictes d'expérience, très fiables et de bonne valeur.

B) LES RESULTATS DES ETUDES IMMUNOLOGIQUES :

a) Le mélanome du hamster type « FORTNER-MOORE » :

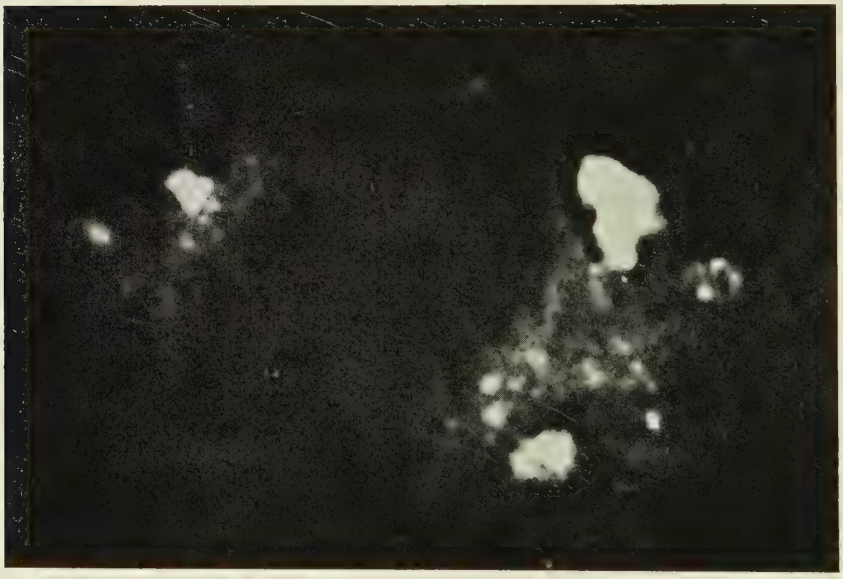
* *L'antigène cytoplasmique* (Pl. XXX) a été rencontré de façon très constante dans les tumeurs transplantables sur la souche 87.341 de MOORE. Les contrôles de spécificité ont toujours été constants.

— Les cellules tumorales montraient un antigène cytoplasmique indiscutable antigène qui occupait tout le cytoplasme, quelquefois en motte, mais le plus souvent en fluorescence diffuse.

— Cet antigène était révélé sur les cellules en culture de la souche MOORE 87.341 par les sérums des hamsters, porteurs de la tumeur FORTNER-MOORE, soit ce qui est beaucoup plus intéressant par les sérums des hamsters porteurs du mélanome chimio-induit par le D.M.B.A.

Cette antigénicité entre les deux types de tumeurs paraît bien en faveur de modifications de protéïnes de même type pour des étiologies différentes.

PLANCHE XXX



Aspect en immunofluorescence de l'antigène cytoplasmique d'un mélanome humain, révélé par un sérum d'un autre malade porteur également d'un mélanome.

* *Un antigène nucléaire « inattendu »* a été trouvé dans la deuxième série du « FORTNER-MOORE » et cette découverte a incité à rechercher la cause de cet antigène pour le moins « inattendu » d'autant plus que la morphologie de la tumeur, comme nous l'avons vu, était très différente (Pl. XVI, fig. 4).

De fait, l'étude des cultures en microscopie électronique a mis en évidence un micro-organisme de type P.P.L.O. ou d'un gros virus.

Il faut toutefois souligner ici que l'antigène des tumeurs mélanomes restait constant malgré la surinfection au cours des passages successifs et qu'il était révélé par le sérum des hamsters porteurs de tumeur antérieurement à l'apparition de l'antigène nucléaire.

Ainsi, il paraît vraisemblable que notre souche FORTNER-MOORE a été contaminée au cours de l'un de ses passages par un virus « surtransformant » qui a modifié la morphologie et les caractères antigéniques, de la cellule tumorale, sans supprimer pour autant les caractères antigéniques d'origine de cette souche.

Si nous n'avions pas connu l'histoire naturelle de la lignée tumorale, on aurait pu conclure à l'origine virale de notre mélanome achromique et l'attribuer au virus mis en évidence.

Il est très possible qu'à l'origine, la tumeur de FORTNER soit d'origine virale, mais il ne s'agit certainement pas de celui que nous avons détecté.

Ce petit incident expérimental montre à quel point on doit être circonspect avant de conclure à l'origine virale d'un cancer, même quand les réactions antigéniques plaident en sa faveur.

* *L'antigène de membrane* n'a jamais pu être mis en évidence dans le mélanome du hamster FORTNER-MOORE. On peut attribuer cette négativité à deux raisons possibles, soit que le hamster se défende mal contre ce type de tumeur, soit que nous n'ayons pas les sérums capables de les détecter. Dans ce but, des hamsters doivent être inoculés par des cellules tumorales irradiées, préalablement à la greffe pour obtenir une réaction de protection.

b) **Le mélanome chimio-induit D.M.B.A. chez le hamster :**

La culture des cellules de ce processus tumoral n'étant pas à l'heure actuelle réalisée, les études immunologiques de détection des antigènes cytoplasmiques et de surface n'ont pu être effectuées.

Par contre, nous venons de le voir, les sérums des animaux ayant cette tumeur révèlent l'antigène cytoplasmique du mélanome FORTNER-MOORE.

c) **Le mélanome du cheval :**

On se heurte pour cette tumeur, au point de vue immunologique, pour le moment, à deux écueils : la difficulté de la mise en culture de cette tumeur et l'absence de sérums réactifs. Le stockage de sérum d'animaux porteurs de tumeur a été fait et il serait également nécessaire d'avoir des sérums de chevaux préparés par des injections de cellules tumorales atténuées par radiations. L'étude reste en suspens, mais elle est loin d'être abandonnée !

d) **Les tumeurs humaines :**

Les études faites chez l'animal ont permis depuis un an de les utiliser dans les mélanomes humains.

1) *L'antigène cytoplasmique* a été retrouvé par G. MEYER de façon constante (157), avec des contrôles de spécificité éloquents, avec des possibilités de croisement entre les sérums de différents malades.

2) *L'antigène* de membrane est plus difficile à mettre en évidence. En effet, les cellules en culture sont souvent abîmées, en survie, d'où une vitalité très faible et pourtant si importante pour décrire un antigène de surface.

De plus, les grains de mélanine qui parsèment le cytoplasme ont une fluorescence propre gênante.

Enfin, les témoins ne sont jamais rigoureux dans ce cas, car il faudrait disposer de tous les organes du donneur pour être sûr de la spécificité tumorale du phénomène.

Malgré cela, dans un cas, G. MEYER et ses collaborateurs ont constaté une antigénicité de membrane, qui n'est pas certes aussi belle que celle que l'on trouve dans les tumeurs expérimentales, mais qui était pour le moins spécifique de l'individu porteur de sa tumeur puisqu'il n'y avait aucune réaction croisée pour les autres sérums dont nous disposions, de malades porteurs de mélanomes.

3) *Le test de transformation lymphoblastique* est utile pour connaître le tonus immunitaire des malades. Ce test est en général positif chez les sujets ayant un tonus normal, mais il est négatif en général dans les tumeurs métastatiques généralisées.

4) *Les tests de lymphotoxicité et de cytotoxicité* prennent actuellement une importance de plus en plus grande, pour avoir une idée précise du potentiel de défense de l'hôte. L'Ecole de Milan avec U. VERONESI, G. DELLA PORTA, G. FOSSATI et leurs collaborateurs (202-203) y insistent beaucoup. Ces techniques mises au point et unifiées doivent être appliquées aux malades dont les dossiers seront versés au ficier du Groupe Mélanome de l'O.M.S.

*
* *

Ainsi l'étude immunologique, aussi bien des antigènes que de la réaction immunitaire de l'hôte des mélanomes, est une source de connaissances importantes dans l'étude de cette maladie, et, nous rappelons que le laboratoire, où nous travaillons, dispose pour ces études des possibilités d'immunofluorescence, de cytotoxicité et de culture mixte de lymphocytes, tant pour les tumeurs expérimentales que pour les tumeurs humaines.

QUATRIEME PARTIE

Etude synthétique

Dans les prémices de ce mémoire, il y a trois ans, nous avions orienté nos recherches sur l'étude anatomo-pathologique et ultrastructurale des tumeurs animales utilisées dans le service pour l'expérimentation.

Ces données morphologiques étaient destinées, si cela était possible, à placer des processus tumoraux dans le cadre nosologique qui leur revenait. On nous demandait également de donner le point de vue du pathologiste sur la valeur de ces tumeurs comme modèle expérimental avant d'entreprendre les essais thérapeutiques à visée immunologique, dans la ligne des travaux antérieurs du service, dans le système virus Polyome-Hamster.

H. BONNEAU avait en effet arrêté les essais thérapeutiques chez l'homme, à la suite de certains phénomènes de facilitations observés à Lyon par M. DARGENT, bien que lui-même n'ait eu que des résultats assez favorables (6 et 7).

Mais, très rapidement, il s'est avéré que la seule recherche anatomo-pathologique était insuffisante pour répondre valablement à toutes les questions posées. Nous avons donc eu recours aux autres secteurs du Laboratoire pour avoir toutes les données biologiques nécessaires.

Chemin faisant, du reste, comme cela est constant en recherche fondamentale, des points particuliers se sont révélés, amenant à examiner nos tumeurs avec des méthodes complémentaires.

Nous étudierons ainsi des faits nouveaux qui évoquent des conceptions étiopathogéniques possibles et provoquent des idées prospectives bien loin de nos préoccupations au départ : celle de la différenciation cellulaire ou des étapes de la transformation maligne. Ces phénomènes sont tellement à l'ordre du jour de la recherche oncologique fondamentale qu'un Congrès sur ces seuls sujets vient de se tenir à Nice en septembre 1971 (210).

Ainsi à la lumière des résultats obtenus dans toutes les expérimentations, nous envisagerons successivement, pour nos tumeurs mélaniques animales :

— Leur cadre nosologique,

— Leur valeur comme modèle expérimental,

— Leurs apports à la biologie générale des mélanomes.

CHAPITRE I

Cadre nosologique des tumeurs animales étudiées

Il est très important dans un protocole expérimental d'avoir une certitude absolue sur le matériel tumoral utilisé, faute de quoi aucun des résultats obtenus ne peut être interprété valablement.

C'est pour cela que nous allons, dans un premier chapitre, voir dans quel cadre entrent les différentes tumeurs animales en expérience, avec les trois critères essentiels suivants :

— La nature mélanocytaire,

— Le type tumoral,

— La tumorigénicité.

I

LE MELANOME SPONTANE "FORTNER-MOORE"

Cette tumeur transplantable, arrivée à Marseille, par avion, en novembre 1968, en culture, provenait d'une tumeur spontanée survenue chez un hamster de l'élevage de FORTNER, une dizaine d'années auparavant. Cette tumeur avait été envoyée à MOORE qui lui-même nous l'avait expédiée, après qu'elle ait subi des dizaines de transplantations sans compter le nombre des cultures entre temps.

De fait, dès les premiers examens histologiques et cytologiques, H. BONNEAU et G. MEYER se sont demandés si cette tumeur était encore une tumeur mélanique et si, au cours de sa longue carrière, elle n'avait pas perdu ses caractères ancestraux ?

A) ORIGINE MELANOCYTAIRE :

a) *Les critères histologiques* (132).

La constitution mélanocytaire d'une tumeur est le critère unique permettant d'en faire une néoformation du tissu mélanogène.

Or, dès l'abord et dès que les premières tumeurs transplantées sont arrivées sous le microscope, aucun signe cytologique n'a permis de le croire.

Certes, il y avait certaines dispositions périthéliales, endocrinoïdes qu'affectent volontiers les mélanomes, mais l'absence totale de pigment aux examens standard ne permettait pas de l'affirmer.

L'histochimie faite à maintes reprises s'est toujours révélée négative, ne décelant pas le pigment mélanique.

L'histo-enzymologie elle-même n'a jamais pu révéler la présence de tyrosinase, la dopa-réaction s'étant toujours révélée désespérément négative.

b) *Les cultures de tissus,* tout au moins les premières subcultures de la souche 87.341 de MOORE ont pu paraître positives au Fontana et à la Dopa-réaction. Mais très rapidement, ces réactions se sont négativées, à croire que les conditions d'existence des cellules dans nos milieux les avaient inhibées !

Renseignements pris, cette souche à son départ des U.S.A. était déjà Fontana et Dopa négatifs et nous pensons que les réactions faites à l'époque, de mise au point récente, étaient sujettes à caution, les pigments mis en évidence étant des pigments hémosidériniques ou des lipofuschines.

c) *L'ultrastructure* restait donc notre dernier recours pour assurer l'origine mélanocytaire de la tumeur. Mais là encore nos espoirs furent déçus, car avec J.-P. CESARINI en 1968, dès l'arrivée de la tumeur, nous affirmions l'absence de toute structure mélanique (mélanosome ou prémélanosome) même à l'état d'ébauche. Les seuls faits à retenir de cet examen étaient le type cellulaire sécrétant, à cytoplasme clair, l'absence de desmosome et les tendances aux micro-villosités en culture de tissus. Mais ces aspects morphologiques ne permettaient en aucun cas de parler de mélanocytes.

Ainsi toute l'équipe des morphologistes était perplexe sur la nature de cette tumeur et sceptique sur son origine mélanique.

d) *Les caractères biologiques* seuls pouvaient donc donner une solution.

1. *La biochimie* elle aussi devait être muette, les recherches de la mélanine et de la tyrosinase sont restées sans réponse, confirmant les résultats histochimiques et histo-enzymologiques.

Nous avons demandé à J.-J. BOURGOIN, de l'équipe de biochimistes du Centre Léon-Bérard de Lyon, de rechercher le taux de l'hémopexine chez nos animaux pour essayer d'obtenir un argument supplémentaire. Ce composé est en effet, semble-t-il, augmenté dans les mélanomes (211).

2. *La génétique,* par contre, montrait l'extraordinaire constance du capital génétique de cette tumeur qui, dix ans après, conservait le même nombre modal, aux alentours de l'hypo-triploïdie et un certain nombre de marqueurs dont certains quasi-constants M1 et M2.

L'étude génétique de Monique BEREBBI sur la souche 87.341 fait ressortir certains faits, qui expliquent peut-être les réactions paradoxales enzymologiques (DOPA +), car il est possible que dans la population diploïde ou tétraploïde de cette culture, se trouvaient des mélanocytes normaux ayant encore de la tyrosinase (44 chromosomes). Les aspects morphologiques de la culture montraient comme le caryogramme, une hétérogénéité cellulaire

Les généticiens du Service apportaient donc le premier argument en faveur de la similitude entre la tumeur de nos animaux et la tumeur originelle de FORTNER, envoyée par MOORE.

3. *Les immunologistes,* avec G. MEYER, devaient apporter un autre argument de valeur. En effet, les cellules des tumeurs du "FORTNER-MOORE" présentent un antigène cytoplasmique révélé non seulement par le sérum de hamsters porteurs de tumeurs du même type, mais également en réaction croisée avec les sérums d'animaux porteurs de mélanomes chimio-induits par le D.M.B.A. (157).

Cette même réaction était bien entendu négative avec le sérum d'animaux porteurs d'autres types de tumeurs, en particulier de tumeurs induites par le virus Polyome.

Cette preuve immunologique est particulièrement importante, mais elle n'est pas encore corroborée par la présence d'un antigène de membrane révélé dans les mêmes conditions. Il est aussi si difficile à trouver que sur les mélanomes humains.

Un fait important à retenir est que la présence d'organite à type de mélanosomes et que l'activité mélanogène ou tyrosinasique n'interviennent en rien dans la localisation et la présence de l'antigène cytoplasmique.

4. *Le marquage isotopique à l'IODOQUINE* I^{125} (133 à 140), malgré le petit nombre d'animaux examinés, apporte un dernier argument à l'origine mélanocytaire des tumeurs du "FORTNER-MOORE". En effet, la fixation isotopique est absolument semblable à toutes les tumeurs mélaniques, chromiques ou non, et comme cette technique est très spécifique, on peut lui accorder une valeur certaine.

Il faudra cependant confirmer ces résultats sur un plus grand nombre d'animaux et avec des essais témoins sur des tumeurs viro-induites sarcomateuses par exemple.

Là encore nous devons mentionner l'absence totale de concordance entre la fixation isotopique à l'Iodoquine I^{125} et la présence ou l'absence de mélanosomes et de tyrosinase.

En résumé : La tumeur transplantable du Hamster FORTNER-MOORE Souche 87.341 du Laboratoire est absolument semblable à la tumeur originelle et elle est mélanocytaire. Elle a conservé son capital génétique et certains de ses chromosomes "marqueurs". Elle fixe l'Iodoquine I^{125} *comme le font les tumeurs mélaniques.*

B) LE TYPE TUMORAL :

L'aspect histologique de cette tumeur est très stéréotypé, quelle que soit la série que l'on envisage. La prolifération se fait en plages uniformes de cellules petites, pauvres en cytoplasme, sans sécrétion mélanique, se disposant autour de néo-vaisseaux ou de fentes vasculaires, prenant un type endocrinoïde : c'est *un carcinome anaplasique indifférencié.*

L'inflexion morphologique de la 2^{e} série où la tumeur a pris un aspect sarcomatoïde pose le problème de l'influence du micro-organisme trouvé dans les cellules.

Cette présence virale a pu provoquer une modification au niveau d'un gène régissant la modulation cellulaire. Du reste, dans les tumeurs humaines, on trouve certaines formes histologiques similaires, à cellules fusiformes, en particulier au niveau de l'œil, ce qui les a fait appeler longtemps des « *Sarcomes mélaniques* ». Et on peut évoquer là la possibilité pour ces tumeurs d'un virus inducteur. Cela corroborerait les idées actuelles émises lors d'une des dernières réunions en 1970, « sur la cellule pigmentaire » aux U.S.A. (non publié), qui donnent aux tumeurs mélaniques une origine virale possible pour certaines tout au moins, l'action des radiations d'une part et des carcinogènes chimiques d'autre part restant valables pour les autres.

En résumé : la tumeur "FORTNER-MOORE" Souche 87.341 est un mélanome acromique anaplasique indifférencié.

C) LA TUMORIGENICITE :

C'est un point important à connaître.

a) *Les caractères cytologiques* sont indubitablement ceux des cellules malignes tant au point de vue histologique qu'en culture où les signes de chevauchement, de pousse tridimentionnelle, en micro-colonies sont indiscutables.

b) *Le pouvoir extensif* de cette tumeur est important. Elle envahit les muscles, les téguments ; elle s'ulcère.

c) *Les métastases* pulmonaires, hépatiques, rénales, ganglionnaires signent sa malignité s'il en était besoin.

d) *La dose tumorale 50 %* qui a été étudiée a bien montré l'extrême potentiel évolutif des cellules transplantées, sans distinction aucune entre les hamsters dorés ou # Albinos. L'injection de 10^3 cellules de la souche 87.341 donne encore 3 tumeurs sur 4 animaux inoculés ainsi, en un mois. La moyenne est de 50 jours de survie à dater du moment de l'inoculation.

e) *L'irradiation des cellules tumorales aux rayons U.V.* par contre, à la dose de 3.000 ergs/mm^2, détruit le pouvoir tumorigène.

C'est un point très important car si les antigènes tumoraux sont conservés malgré l'irradiation aux rayons U.V., c'est un matériel tumoral utilisable pour tenter, dans un organisme déficient, de réveiller les défenses immunitaires de l'hôte.

En résumé : La tumeur a des caractères cytologiques et culturaux de malignité et elle possède un haut pouvoir de tumorigénicité.

Au terme de cette étude synthétique sur la tumeur transplantable du Hamster, nous pouvons donner les conclusions suivantes :

Cette tumeur, qui ne possède plus aucun des caractères histologiques, ultrastructuraux et biochimiques des mélanocytes actifs, sécrétants de la mélanine, a, cependant, conservé au cours de douze années de transplantation et de cultures : ses antigènes spécifiques des tumeurs mélanocytaires, ainsi que son capital génétique. Elle fixe l'Iodoquine I^{125} qui paraît spécifique des tumeurs mélaniques.

La tumeur est un mélanome achromique anaplasique indifférencié. Elle possède les caractères cytologiques et culturaux de malignité avec un très haut pouvoir de tumorigénicité, en transplantation.

On doit donc attribuer à cette tumeur l'appellation de : « MELANOME MALIN ACHROMIQUE TRANSPLANTABLE FORTNER-MOORE SOUCHE 87.341 R.P.M.I. SPONTANE A L'ORIGINE[6] ».

II

LE MELANOME DU HAMSTER CHIMIO-INDUIT PAR LE D. M. B. A.

Les tumeurs mélaniques obtenues dans le Laboratoire par l'injection de D.M.B.A. nous posent beaucoup moins de problèmes, quant à leur nature morphologique, par contre la tumorigénicité de ces néoformations restait à préciser.

A) ORIGINE MELANOCYTAIRE :

a) *Les critères histologiques :* L'induction chimique se fait indubitablement au niveau des cellules pigmentaires si abondantes chez l'animal, en particulier au niveau des gaines des poils et des follicules pileux.

Du reste, l'abondance de la pigmentation des néoformations est telle que l'on discerne difficilement, en histologie optique, les détails cellulaires.

Les nodules sous-épidermiques et au plus hypodermiques superficiels forment un amas noirâtre absolument semblable à ce que l'on voit dans le nævus bleu (tumeur mongolienne).

Dans cette tumeur apparaît le rôle si important des mélanophages. Ce sont eux qui emmagasinent le pigment et paraissent le transporter dans le tissu proche, avoisinant le nodule primitif, comme dans la mélanose de DUBREUILH.

b) *Les critères ultrastructuraux,* s'il en était besoin, viennent affirmer la présence de deux types cellulaires : les mélanocytes et les mélanophages. Ces derniers sont beaucoup plus nombreux que les mélanocytes et ils contiennent des agrégats de mélanosomes.

c) *Les critères culturaux* sont absents car, jusqu'à ce jour, les cultures n'ont jamais poussé ou l'on a eu uniquement des cellules en survie.

Les raisons des difficultés des tumeurs chimio-induites à pousser « in vitro » sont probablement dues à plusieurs faits :

1. L'abondance du pigment qui est rejeté par les cellules donne aux milieux de culture un produit toxique qui rend les conditions de pousse très difficiles.

2. La très grande richesse en mélanophages et la relative pauvreté en mélanocytes sont certainement un facteur prépondérant.

Le mélanophage bourré de mélanosomes, qu'il n'arrive pas à détruire malgré ses enzymes protéolytiques, est une cellule en bout de course dont le potentiel reproductif est extrêmement limité pour ne pas dire nul.

F.-J. LEJEUNE a montré dans le mélanome chromique de la souris type HARDING-PASSEY, les caractères distinctifs de ces deux types cellulaires (101).

Le mélanocyte contient dans ses prolongements dendritiques de la tyrosinase (DOPA +) et les celules se détachent facilement du verre par la trypsine.

Les mélanophages par contre sont dopa négatifs, mais phosphatases acides positives et ils ne sont pas décolés des parois du flacon de culture par la trypsine.

Dans le Laboratoire, on essaye en ce moment d'acclimater la tumeur chimio-induite D.M.B.A. en milieu péritonéal, comme l'a fait LEJEUNE pour le HARDING-PASSEY. Les cellules mélanocytaires, si elles sont malignes, se grefferont sur le péritoine alors que les mélanophages ne se grefferont pas.

d) *Les autres critères* génétiques et immunologiques n'ont pu être testés, faute de cellules cultivables pour le moment.

Quant à la biochimie, les quantités de tumeurs sont trop minimes pour une étude suivie.

En ce qui concerne le marquage isotopique à l'Iodoquine I^{125}, N. SAFI doit le faire incessamment.

En résumé : Les tumeurs induites chez le hamster par le D.M.B.A. sont des néoformations intra-dermiques, d'origine mélanocytaire mais qui comportent un contingent encore plus élevé de mélanophages.

B) LE TYPE TUMORAL :

Nous avons dit la difficulté rencontrée au microscope optique pour étudier cette tumeur.

L'histologie permet de noter la relative localisation des néoformations que si elles ne sont pas encapsulées, ne s'infiltrent pas au loin et restent nodulaires. Il y a une véritable barrière de protection entre l'épiderme et les cellules « noires » (Pl. XX, fig. 3).

La cytologie est ici pratiquement impossible, mais les coupes semi-fines montrent bien la texture cellulaire.

L'ultrastructure révèle que si les mélanosomes sont dysplasiques, les anomalies sont du type de ce que l'on rencontre dans la mélanose de DUBREUILH, par exemple.

Mais on ne retrouve pas les grandes anomalies que l'on voit dans les mélanocytes malins.

En résumé : Les tumeurs multiples chimio-induites chez le hamster par le D.M.B.A. s'apparentent aux naevi cellulaires mélaniques bénins et sont semblables histologiquement au naevus bleu.

C) LA TUMORIGENICITE :

a) *Les caractères anatomo-pathologiques et cytologiques* sont ceux d'une tumeur bénigne :

— absence d'infiltration loco-régionale,

— absence de métastase,

— dysplasie simple au microscope électronique des mélanosomes.

b) *Les essais de greffes* sont relativement sans succès. Une seule tumeur à ce jour a pu être greffée et la greffe conserve le type de la tumeur primitive.

Dans certains cas, les greffes successives ont pu être faites et aux 6e ou 7e passages, on obtenait une transformation maligne avérée avec des métastases comme l'a signalé AUBERT (160).

Par contre, lorsque l'on utilise l'uréthane, comme inducteur chimique, ainsi que l'on fait, à la suite de nombreux auteurs, B. OBERMAN et M.-R. RIVIERE (172), on obtient des tumeurs malignes métastatiques et transplantables en série.

Nos constatations recoupent les constatations des différents auteurs ayant utilisé le D.M.B.A. (55 - 168 à 171).

Parmi les incidents de parcours de notre travail, notons l'apparition, chez un hamster Albinos, après injection de D.M.B.A., d'un sarcome des parties molles qui, contrairement à nos nodules mélaniques, a un très haut potentiel tumorigène. Cette tumeur est cultivable et transplantable en série.

ILLMAN et GHADIALLY (58), RAPPAPORT, PIETRA et SHUBIK (60), QUEVEDO (59) réussirent à produire des tumeurs mélaniques chez le hamster Albinos par application et non injection de 6-12 D.M.B.A. Les tumeurs sont moins pigmentées que chez le hamster doré.

L'interprétation de ces observations par ces différents auteurs est que le D.M.B.A. serait susceptible de transformer les mélanocytes achromiques et d'activer le système enzymatique déficient. On peut également penser que le produit chimique détruit l'inhibiteur de la synthèse de la mélanine, redonnant à la cellule achromique son potentiel normal.

En résumé : Nous pouvons affirmer que, dans notre expérimentation actuelle, la tumorigénicité du mélanome induit par le D.M.B.A. est très faible, quasi nulle et que l'on doit la considérer comme une tumeur bénigne.

*
* *

Ainsi les faits rassemblés dans cette expérimentation nous amènent aux conclusions suivantes :

Les tumeurs induites chez le hamster par le 9-10 diméthyl 1-2 benzanthracène sont des néoformations dermiques, d'origine mélanocytaire, qui comportent un contingent encore plus élevé de mélanophages. Elles s'apparentent, quant à leur structure, aux nævi cellulaires mélaniques bénins et sont semblables au neavus bleu. Il s'agit d'une tumeur bénigne.

Nous proposons de lui réserver la dénomination de « MELANOME BENIN DU HAMSTER CHIMIO-INDUIT PAR LE D.M.B.A. ».

III

LES TUMEURS " NOIRES " DU CHEVAL

Rappelons dès l'abord que la question à résoudre en ce qui concerne les tumeurs mélaniques du cheval, était de savoir si les néoformations étaient valables pour une étude biochimique de la protéine de soutien du mélanosome et si les résultats obtenus seraient valables pour l'homme.

A) ORIGINE MELANOCYTAIRE :

a) *Les critères histologiques :* L'étude des tumeurs du cheval ont permis de s'assurer d'une façon certaine que celles-ci comportaient deux contingents cellulaires, l'un mélanocytaire, souvent difficile à mettre en évidence en raison de l'importance du pigment mélanique, l'autre phagocytaire prédominant et surtout à type de cellules géantes.

C'est dans un processus métastatique (Pl. XXII, fig. 4) que nous avons pu mettre en évidence des cellules beaucoup plus claires à pigment finement granuleux, qui sont des mélanocytes.

La nature mélanocytaire de la tumeur ne pouvait du reste pas faire de doute, en raison de l'importance de la pigmentation qui « tatoue » littéralement les organes envahis.

b) *Les critères ultrastructuraux,* comme pour le mélanome chimio-induit par le D.M.B.A. chez le hamster, viennent uniquement apporter des précisions sur ces mélanocytes et sur les mélanophages, malgré les difficultés de l'examen au microscope électronique de ces tumeurs, qui, au début, avaient été incluses dans un support insuffisamment dur.

Les mélanophages dominent largement la situation et ils sont bien reconnaissables aux vastes lacunes lysosomiales contenant des agrégats de mélanocytes.

Mais l'apport certain de l'ultrastructure, en particulier dans l'étude faite sur culot de centrifugation, est très important.

La structure des mélanosomes du cheval paraît semblable à celle de l'homme, avec une protéine paracristalline fibrillaire, enroulée en ressort.

Par ailleurs, dans l'observation privilégiée N° X, nous avons pu étudier les malformations des mélanosomes qui sont absolument identiques à celles que l'on voit dans les mélanocytes malins de l'homme.

Il n'en est pas toujours ainsi et parfois, dans les tumeurs uniques et isolées, les états dysplasiques sont identiques à ceux rencontrés dans les mélanoses humaines ou animales (D.M.B.A.).

c) *Les critères culturaux* n'existent pas pour les tumeurs équines, car nous avons rencontré les mêmes difficultés que pour le mélanome bénin induit par le D.M.B.A., chez le hamster.

Il y a là une lacune que l'on devra combler dans les travaux futurs car cela empêche toute étude génétique et immunologique de la tumeur.

d) *Les critères biochimiques,* par contre, ont eté très poussés grâce à l'abondance tumorale et nous avons vu que les résultats sont sensiblement les memes que chez l'homme pour le taux de la tyrosinase et de son activité. Les β glucuronidases sont élevées dans les tumeurs mélaniques du cheval et à peu près identiques à celles du hamster.

Enfin, et c'est un point très important à rappeler, c'est la présence dans les localisations a distance de β glucuronidase et de tyrosinase, ce qui confirme nos données histologiques quant a la présence, dans les néoformations mélaniques a distance de la tumeur originelle, de mélanocytes actifs. Il devient alors difficile, comme dans notre observation N° X, de parler de « mélanose » comme le pense A. LEVENE ou de tumeur semblable à un naevus bleu (204).

En résumé : La nature mélanocytaire de la tumeur « noire » du cheval ne peut faire de doute, mais elle est noyée par l'abondance des mélanophages.

B) LE TYPE TUMORAL :

L'étude histologique des néoformations équines nous fait penser qu'il y a deux types distincts de tumeurs mélaniques chez cet animal :

— Les tumeurs uniques, découverte inattendue à l'abattage des animaux, ont une morphologie très semblable à celle des mélanomes bénins chimio-induits. De forme nodulaire, bien délimitées, sans extension nette, en général de petites tailles.

— Les tumeurs volumineuses avec de larges travées lymphangitiques, s'étendant à tout l'organisme, dans lesquelles les constatations histologiques de mélanocytes dans les ganglions ou dans les infiltrations cardiaques, ne peuvent être attribuées à un simple « déplacement » de cellules non tumorales.

Du reste, la microscopie électronique est là pour confirmer le type malin des mélanosomes et pré-mélanosomes.

Il se pourrait, du reste, très bien que ces deux aspects soient tout simplement deux stades différents de la maladie cancéreuse chez le cheval.

Chez l'homme, il existe une affection très similaire, survenant chez le sujet âgé (comme pour la tumeur équine), qui passe par trois étapes : une de mélanose ou état pré-cancéreux, une de carcinome « in situ », pour aboutir en fin de course au carcinome infiltrant et métastatique : c'est la mélanose de DUBREUILH.

En résumé : La tumeur « noire » du cheval, d'origine mélanocytaire, affecte deux types : l'un semblable au mélanome bénin chimio-induit : une mélanose ; l'autre, probablement stade évolutif du précédent : un mélanome malin.

C) LA TUMORIGENICITE :

a) Les caractères anatomo-pathologiques

Les deux types histologiques que nous venons de déterminer annoncent déjà les nuances que nous allons trouver dans cette tumeur.

Les aspects très orthoplasiques, hyper-sécrétants en mélanine, des mélanocytes et l'environnement extraordinaire par les mélanophages, rendent le diagnostic en optique très délicat, mais les critères ultrastructuraux qui différencient nettement les mélanocytes et les mélanophages, d'une part, et les atypies des mélanosomes, d'autre part, permettent de préciser la nature même du processus.

De plus, l'étude des localisations secondaires ne peut faire de doute sur leur nature métastatique.

b) Les caractères cliniques et évolutifs

Il ne saurait être question pour le moment de pratiquer des greffes chez le cheval, car il n'y a pas d'élevage d'animaux suffisamment sélectionnés pour ne pas avoir de rejet d'histo-compatibilité.

Mais l'évolution clinique montre que, bien souvent, ces animaux, qui sont abattus en raison de leur âge, ne présentaient pas de tumeurs visibles et les nodules isolés que l'on trouve n'avaient pas d'influence sur leur état général.

Par contre, dans les tumeurs généralisées à localisations multiples, cérébrales même, les animaux sont souvent amaigris et l'un d'eux présentait un syndrome paraplégique en fonction d'une métastase para-vertébrale.

c) Les caractères biologiques

La nature métastatique des localisations secondaires est signée par deux preuves, l'une histologique, comme nous venons de le voir, et l'autre biochimique par la détection, à distance, des β glucuronidases et de la tyrosinase que l'on trouve dans les cellules tumorales. Ces enzymes n'existent pas, en effet, dans les mélanophages.

En résumé : Les tumeurs « noires » équines, dont la tumorigénicité est actuellement très discutée, passent pour nous par deux stades : l'un de mélanose « pré-cancéreuse » et l'autre de tumeur maligne métastatique. Les preuves sont non seulement histologiques, mais encore ultrastructurales et biochimiques.

*
* *

Ainsi, l'étude anatomo-pathologique ultrastructurale et biochimique des tumeurs « noires » du cheval nous amène aux conclusions qui suivent :

Les tumeurs « noires » du cheval sont des néoformations mélanocytaires d'origine cutanée, qui sont hyperpigmentées, accompagnées d'une réaction phagocytaire mélanophagique intense, qui masque le plus souvent les cellules tumorales. Elle peuvent se présenter sous deux types, stades évolutifs d'un même processus, celui de mélanose pré-cancéreuse et celui de mélanome malin métastatique, l'évolution pouvant se faire sur plusieurs années.

Nous pensons qu'il faut désigner ces tumeurs, suivant leur type, sous le vocable de « MELANOSE ET DE MELANOME MALIN DU CHEVAL ».

CHAPITRE II

Valeur expérimentale des trois tumeurs mélaniques étudiées

Nous avons essayé de mettre à leur juste place les trois tumeurs animales qui ont fait l'objet de notre étude : l'une bénigne, l'autre très maligne et très indifférenciée, la troisième à mi-chemin entre les deux autres, à « malignité intermédiaire », progressive, pourrions-nous presque dire.

Ce qu'il importe maintenant, c'est de voir si ce matériel répond aux exigences expérimentales des différents secteurs du Groupe Mélanome et surtout pour les essais thérapeutiques.

Nous verrons donc pour chacune des tumeurs étudiées :

— La valeur pour les essais thérapeutiques.

— La valeur pour les travaux d'oncologie fondamentale.

I

LE MELANOME FORTNER-MOORE DU HAMSTER

A) Valeur pour les essais thérapeutiques à visée immunologique :

A l'origine, cette tumeur avait été demandée à G. MOORE pour avoir un parallèle entre les essais thérapeutiques à visée immunologique (en suivant les préceptes et les techniques de R. LATARJET) des tumeurs sarcomateuses induites par le virus Polyome et les tumeurs mélaniques provenant d'un tissu différent.

Du reste, entre temps, R. FAVRE poursuivait dans le laboratoire un essai identique sur une tumeur salivaire, également induite par le virus Polyome sur la souris Akr, dont nous avons rapporté par ailleurs l'étude morphologique (5).

Les incertitudes anatomo-pathologiques sur la nature exacte de la tumeur, que nous avions à notre disposition et que nous avons intitulée « Mélanome « FORTNER-MOORE », ont obligé à de nombreuses recherches histochimiques, enzymologiques, ultrastructurales, isotopiques et immunologiques, avant d'arriver à la certitude de son origine mélanocytaire ; et font que les tentatives de protection ne furent qu'ébauchées.

A l'heure actuelle, connaissant bien cette tumeur, doit-on la prendre pour modèle expérimental dans les essais de protection ou de prévention des récidives ?

Son indifférenciation la place au même niveau que les fibro-sarcomes et assez loin derrière la tumeur myo-épithéliale salivaire de la souris Akr.

En ce qui concerne cette tumeur mélanique, elle ne représente, par sa forme histologique, que la minorité des tumeurs mélaniques humaines. Très souvent les mélanomes malins prennent un aspect histologique achromique, mais le Fontana et la Dopa-réaction sont le plus souvent positifs et de plus la microscopie électronique met en évidence des mélanosomes plus ou moins matures.

Pour les raisons que nous venons d'exposer, nous pensons qu'il est préférable de ne pas utiliser cette tumeur, surtout pas dans le système mélanome.

Par contre, étant donné sa définition exacte, ses possibilités de culture, sa haute tumorigénicité, sa dose tumorale 50 % bien connue, elle est parfaitement utilisable comme modèle de tumeur indifférenciée, anaplasique.

B) Valeur pour les travaux d'oncologie fondamentale :

a) **Travaux d'hybridation somatique.** Nous avons vu tout l'intérêt de l'étude caryotypique de cette tumeur, la constance de son capital génétique et la présence de chromosomes marqueurs.

Elle doit pouvoir servir au secteur de génétique qui travaille sur l'hybridation cellulaire avec des cellules de hamster chinois. Une hybridation pourrait se faire avec cette cellule maligne reconnaissable à ses marqueurs et une cellule de hamster chinois.

Si cette hybridation s'effectuait, on pourrait alors envisager un essai thérapeutique d'un type très particulier, qui a été entrevu ces derniers temps à l'aide de cellules hybrides.

b) **Les travaux de différenciation cellulaire,** si en vogue actuellement (210), peuvent s'envisager pour une équipe spécialisée dans ce domaine. Il serait en effet remarquable de redonner au mélanocyte de notre tumeur FORTNER-MOORE, indifférenciée, anaplasique, ses sécrétions enzymatiques lui permettant de fabriquer la mélanine, tout en lui conservant ses caractères de cellule maligne.

En résumé : Le mélanome FORTNER-MOORE du hamster peut servir aux essais thérapeutiques à visée immunologique, car c'est une tumeur bien testée et facilement transplantable. Cependant, son type histologique répond assez peu à la majorité des tumeurs mélaniques humaines. Par contre, son utilisation reste valable pour des travaux de génétique d'hybridation somatique et surtout pour des essais de différenciation cellulaire.

II

LE MELANOME CHIMIO-INDUIT D.M.B.A. DU HAMSTER

A) Valeur pour les essais thérapeutiques à visée immunologique :

Les tumeurs chimio-induites DMBA chez nos hamsters dorés syriens ont été jusqu'à présent bénignes. Elles ne répondent donc absolument pas aux critères recherchés pour les essais thérapeutiques à visée immunologique.

Ce sera peut-être possible si, comme cela est prévu dans des travaux ultérieurs, on arrive à en faire un mélanome malin.

En effet, au départ de cette recherche tumorale, il entrait dans les intentions expérimentales d'avoir une tumeur dont l'antigénicité était différente de celle des tumeurs viro-induites, sans préjuger de la nature du FORTNER-MOORE, qui a peut-être à son origine une imprégnation hormonale.

Les tumeurs chimio-induites présentent en effet une antigénicité spécifique de la tumeur induite et uniquement de cette tumeur. Deux tumeurs sur le même animal, induites par le même carcinogène chimique, n'ont pas la même antigénicité.

Les essais thérapeutiques auraient donc dans ce cas une visée assez différente mais particulièrement utile à connaître car certains mélanomes humains peuvent être chimio-induits.

B) Valeur pour les travaux d'oncologie fondamentale :

a) **Essais de transformation maligne :**

Nous avons vu par ailleurs que le hamster se prête particulièrement bien à l'induction des tumeurs mélaniques malignes. M. R. RIVIRE, M. GUERIN et Coll. (205) ont obtenu un mélanome M. 622 greffable et métastasant, du hamster doré par une irradiation de 600 r.

L'uréthane (carbamate d'éthyl) s'est révélé être un produit extrêmement actif pour la production des tumeurs mélaniques chez le hamster (PIETRA, SHUBIK (63), M. R. RIVIERE, M. GUERIN et Coll. (172)). Ce sont des tumeurs chromiques métastasantes-greffables en série.

Depuis 1958, KIRKMAN et Coll. (62) ont montré la production de mélanomes malins par les androgènes-œstrogènes.

Or, notre tumeur DMBA est une tumeur bénigne et il serait particulièrement intéressant d'obtenir une transformation maligne que l'on pourrait suivre à l'aide de cocarcinogènes hormonaux par exemple ou par la surinfection par un virus, comme cela s'est produit incidemment dans 2e série de nos hamsters FORTNER-MOORE.

b) **Cellule bénigne témoin :**

Dans l'étude qui est poursuivie par ailleurs sur la structure de la membrane cellulaire par Françoise BIRG, la cellule du mélanome bénin (chimio-induit DMBA) pourra servir de témoin par rapport à la structure des cellules des mélanomes malins.

En résumé : Le mélanome chimio-induit par le DMBA du hamster est une tumeur bénigne qui ne répond pas aux exigences des essais thérapeutiques. Elle est le point de départ pour des essais de transformation maligne d'une tumeur bénigne par des cocarcinogènes physiques, hormonaux ou viraux. La cellule bénigne qui la constitue peut servir de témoin dans les études des structures de surface des cellules malignes.

III

LA MELANOSE ET LE MELANOME MALIN DU CHEVAL

A) Valeur pour les essais thérapeutiques :

Il ne peut être question d'essais thérapeutiques sur le cheval. Les tumeurs ne sont mises en évidence qu'au cours de l'abattage et les moyens réduits des services de recherches ne leur permettent pas d'entretenir de gros animaux ! !

B) Valeur pour les travaux d'oncologie fondamentale :

J. P. KLEISBAUER, en choisissant le cheval pour ses études biochimiques sur la structure du mélanosome et de ses protéines de structure, a pensé surtout à l'importance du matériel qu'il aurait.

Mais il importait de savoir si la structure et la nature du processus tumoral répondait à des formes similaires chez l'homme.

Les données histologiques et ultrastructurales permettent d'affirmer contre les avis de beaucoup, que la plupart des tumeurs du cheval qui nous sont fournies, sont des tumeurs à potentialité maligne. Car si l'on admettait que les traînées lymphangitiques, les imprégnations musculaires, cardiaques, pleurales et ganglionnaires, étaient simplement le fait de la migration des histiocytes « bourrés de mélanine », nous serions obligés de réviser complètement nos notions de carcinologie générale sur les processus métastatiques ! !

En effet on pourrait admettre, comme dans l'hémosidérose, le transfert et la localisation du pigment, mais comment alors admettre dans les ganglions ou le muscle cardiaque, la présence de mélanocytes. L'histologie peut être discutable, l'électronique beaucoup moins, quant à l'histo-enzymologie elle doit emporter la conviction, car dans les localisations secondaires on trouve de la tyrosinase et de la β glucuronidase que l'on ne rencontre pas, ou en moins grande quantité, dans les mélanophages.

En effet, les histiocytes peuvent avoir phagocyté non seulement les mélanosomes, mais également des fragments de mélanocytes et contenir ainsi de la tyrosinase ou de la β glucuronidase en quantité minime, de même qu'ils peuvent montrer de fausses réactions antigéniques tumorales cytoplasmiques pour les mêmes raisons.

Si la nature maligne des tumeurs généralisées ne fait pas de doute pour nous, faut-il encore admettre que le mélanosome du cheval est identique dans sa structure à celui de l'homme.

En effet, dans la lignée animale, le mélanosome de la souris dans le mélanome de HARDING-PASSEY est très différent et ne peut servir d'élément d'étude se rapportant ensuite à l'homme.

Le mélanosome du cheval est peut-être un peu plus grand que l'humain, mais sa protéine de soutien se présente avec les mêmes caractéristiques.

En résumé : Les tumeurs mélaniques du cheval dans leur forme maligne sont un modèle parfait pour l'étude biochimique, le mélanocyte équin étant semblable à celui de l'homme.

CHAPITRE III

Les apports des tumeurs animales à la biologie des mélanomes humains

Au cours de l'étude des tumeurs mélaniques animales, certaines données se sont faites jour, données qui étaient parfaitement applicables à la pathologie des mélanomes humains.

Cet apport se fait sur différents domaines de la biologie tumorale :

— La morphologie,

— L'immunologie ,

— La biochimie,

— L'étiopathogénie et leurs applications cliniques et thérapeutiques.

I

LES APPORTS A LA MORPHOLOGIE

A) Mélanocytes et mélanophages :

Nous connaissons bien actuellement les travaux de CLARK sur la classification des tumeurs mélaniques de la peau chez l'homme et les tumeurs animales n'apportent rien de plus à leur connaissance, si ce n'est l'importance qu'il faut attribuer aux histiocytes.

Nous avons vu que dans les tumeurs induites par le DMBA et dans le mélanome du cheval, l'importance des mélanophages est telle que l'on peut se demander si dans ces deux formes tumorales il ne s'agit pas autant d'une maladie du mélanocyte que du mélanophage !

Il est bon en clinique humaine de voir la part de chacune de ces cellules dans le processus tumoral et dans leur propagation à distance. Cette distinction doit se faire facilement sur les coupes semi-fines et en ultrastructure.

L'importance de la pigmentation et l'abondance des macrophages semblent, comme chez l'animal, un facteur d'évolutivité atténuée, comme dans la mélanose de DUBREUILH.

Les techniques histo-chimiques et histo-enzymologiques permettent également de bien les différencier :

— *Le mélanocyte est :* Tyrosinase (DOPA) +
β glucuronidase +
Phosphatase acide —

En culture la trypsine le détache du verre.

— *Le mélanophage est :* Tyrosinase —
β glucuronidase —
Phosphatase acide +

En culture, la trypsine ne le décolle pas du verre.

Cette distinction entre les deux types cellulaires est particulièrement importante à faire, car les réactions antigéniques sont différentes. Le matériel fourni aux immunologistes doit en faire mention, faute de quoi leurs résultats risquent d'être discordants.

Cette distinction entre les deux types cellulaires est particulièrement importante à faire, car les réactions antigéniques sont différentes. Le matériel fourni aux immunologistes doit le préciser, faute de quoi leurs résultats risquent d'être discordants.

B) Les tumeurs anaplasiques :

Le mélanome FORTNER-MOORE s'est révélé un modèle histologique extrêmement fructueux pour l'étude complète d'une tumeur indifférenciée et elle nous a montré que l'étude histo-chimique et histo-enzymologique aussi poussée qu'elle soit ne peut donner, au diagnostic, une orientation précise, et que seules d'autres techniques biologiques ont pu permettre de l'identifier : immunologie, génétique, isotopie.

Cette néformation nous a révélé jusqu'à quel point une tumeur mélanique peut arriver à l'anaplasie avec une délétion enzymatique complète de sa fonction mélanogène.

En résumé : Au point de vue morphologique, il faut faire ressortir l'importance de la distinction entre mélanocytes et mélanophages. Cette différence se base sur des critères histo-enzymologiques et ultrastructuraux, ce qui évitera, pour les réactions immunologiques, des erreurs d'interprétation.

II

LES APPORTS DE L'IMMUNOLOGIE ET DE LA GENETIQUE

A) Les antigènes tumoraux :

C'est certainement cette branche de la biologie qui apporte actuellement le plus d'aide et le plus de progrès dans la connaissance des tumeurs humaines.

C'est en grande partie l'immunologie qui a permis de caractériser de façon précise la tumeur indifférenciée du hamster. Elle en a montré aussi la constance malgré les centaines de transplantations des tumeurs.

Dans cette tumeur, la génétique a apporté une contribution importante en montrant la constance de son nombre modal et également la conservation de ses chromosomes marqueurs. C'était une preuve de plus pour cette néoformation indifférenciée d'être la même tumeur que celle que FORTNER avait utilisée au départ. Au cours de sa vie expérimentale, elle est arrivée à l'anaplasie, ce qui se voit souvent chez l'homme où entre la tumeur primitive et la métastase il y a une pareille différence. On connaît bien ces tumeurs, fortement chromiques au niveau de la peau qui, dans les cancers secondaires (une transplantation au fond !), deviennent méconnaissables, anaplasiques.

Toutes les techniques de mise en évidence des antigènes de membrane et des antigènes cytoplasmiques furent mises au point sur nos tumeurs animales et le passage à l'homme fut donc possible.

C'est ainsi que se sont révélées les réactions antigéniques croisées ; les sérums de malades porteurs d'une tumeur mélanique révélaient les antigènes des cellules mélaniques malignes des autres malades.

B) Les réactions hôte-tumeur :

Au cours de ces derniers mois, l'étude coopérative des Groupes Mélanomes de l'O.M.S. et de l'E.O.R.T.C. ont mis en exergue la nécessité d'avoir

des examens « fiables » et valablement comparatifs entre les différents centres anti-cancéreux du monde entier.

Ces techniques sont mises au point grâce aux tumeurs expérimentales. Dans le laboratoire, la tumeur FORTNER-MOORE et les tumeurs induites par le virus Polyome furent particulièrement utiles pour cela.

En dehors du test de transformation lymphoblastique, il est possible d'utiliser les données des tests de lympho et de cyto-toxicité. Ces examens permettent de connaître le potentiel immunologique du malade contre sa tumeur mélanique.

Mais pour pouvoir utiliser valablement ces tests, il faut, lors de l'ablation de la tumeur initiale, confier au biologiste un fragment de tumeur et du sang du malade pour pouvoir suivre le patient au cours de l'évolution de sa maladie

D'après les travaux actuels qui n'en sont pour la plupart qu'à un stade préliminaire, on constate en général une absence de réaction de défense au moment de l'exérèse de la tumeur, si celle-ci est étendue ou métastatique. Elle peut être positive si la tumeur est localisée et à la phase de début.

Après l'exérèse, si la masse résiduelle est nulle, ou peu importante, les tests se positivent indiquant une réactivation des défenses de l'organisme.

Dans les récidives, au contraire, les tests redeviennent négatifs.

En résumé : la tumeur FORTNER-MOORE a montré au cours d'années de transplantations, la constance des antigènes tumoraux spécifiques des tumeurs mélaniques et de son capital génétique.

Elle a permis également de mettre au point toutes les techniques de lympho et de cyto-toxicité qui vont servir à tester valablement, chez l'homme, les réactions de défense.

III

LES APPORTS DE LA BIOCHIMIE

C'est surtout le mélanome du cheval qui a permis d'entreprendre une étude biocimique de ces tumeurs.

— La mise en évidence, dans les localisations multiples des tumeurs généralisées, des enzymes propres aux mélanocytes. est extrêmement importante car elle a donné un argument de poids à la nature maligne de ce que beaucoup considèrent comme une mélanose.

— La caractérisation dans les cellules indifférenciées de β glucuronidase, alors que la tyrosinase a disparu, montre que la cellule anaplasique conserve une activité enzymatique. La présence de tyrosine indique également le potentiel de cette cellule qui conserve ses métabolismes comme dans la cellule différenciée.

— L'étude de la protéine de soutien du mélanosome et de la mélanine constitutive doit apporter des éclaircissements à la déviation que l'on observe dans les cellules mélaniques malignes, ainsi que sur l'enchaînement des réactions nécessaires à la synthèse de cette protéine.

IV

CONTRIBUTION A L'ETIO-PATHOGENIE DES MELANOMES

Les faits expérimentaux qui ont été exposés nous ont révélé que les mélanomes expérimentaux peuvent être provoqués par des facteurs multiples.

Le hamster est un animal réactif particulièrement utile pour l'étude de la biologie des mélanomes.

On peut induire chez lui par des produits chimiques très divers, dont les plus utilisés sont le D.M.B.A. et l'Uréthane, des tumeurs de potentialité tumorale diverse : tumeur bénigne pour les uns, maligne pour les autres.

Les radiations ionisantes peuvent donner seules ou associées aux carcinogènes chimiques, des tumeurs transplantables et métastatiques mélanocytaires.

Les hormones œstro-androgéniques seules ou associées à d'autres carcinogènes, sont également inductrices de mélanomes.

Seule l'action virale n'a pas encore été démontrée, mais certains faits apportent des arguments favorables à cette hypothèse : les réactions antigéniques croisées en particulier. Dans nos expériences, nous avons vu les modifications de la cellule tumorale FORTNER-MOORE, par la présence d'un virus. L'inflexion morphologique de la cellule mélanocytaire indifférenciée montre qu'elle est peut-être une cellule « compétente » pour l'intégration d'un génome viral.

En pathologie humaine, on voit des faits superposables.

La lenteur d'évolution de la mélanose de DUBREUILH, son passage au stade de cancer « in situ » et sa transformation maligne sont à mettre en parallèle avec la mélanose et le mélanome malin du cheval.

— Le fait que cette tumeur a souvent une localisation sur les parties découvertes du corps fait pencher vers l'hypothèse d'une action par les radiations ultra-violettes.

— Certains mélanomes, par contre, qui surviennent chez des adultes jeunes et souvent des femmes dans certains territoires de la côte Pacifique des U.S.A., doivent être en rapport avec une origine virale, car ce sont justement ces tumeurs qui donnent des réactions immunologiques croisées et qui ont une évolution rapide et sur lesquelles les radiations sont sans action.

— L'action hormonale est certaine et J.-M. SPITALIER et R. AMALRIC (212) ont fait ressortir l'importance du sexe dans l'épidémiologie des mélanomes. On a même pu parler de « sexe » tumoral, idée populaire répandue en Provence, qui a trouvé une confirmation dans la génétique expérimentale ! Les tumeurs transplantées conservent les chromosomes sexuels X X ou X Y de la tumeur initiale, quel que soit le sexe de l'animal auquel on a fait la greffe (125).

Ainsi, notre travail, s'il apporte quelques notions nouvelles à l'oncologie des mélanomes, il n'en reste pas moins un dur labeur à accomplir pour approcher plus près de la vérité !

Quoi qu'il en soit, parti ssur l'étude de données morphologiques, nous avons été obligés d'aborder bien des domaines de la biologie. Il s'agit donc d'un travail d'équipe et d'une recherche « groupée ». A l'heure actuelle, de plus en plus se créent des groupes coopératifs pour rassembler les éléments que l'on peut avoir sur une tumeur donnée. C'est le rôle coordinateur qu'ont choisi des organismes internationaux comme l'O.M.S. et l'E.O.R.T.C., ou une nation comme la France, avec le *Centre International de Recherche sur le Cancer,* à Lyon.

*
* *

Ainsi, au terme de ce mémoire, nous ne pouvons que conseiller aux cliniciens, lors du traitement des tumeurs mélaniques malignes, d'utiliser toutes les techniques mises à leur disposition (Tableau XII).

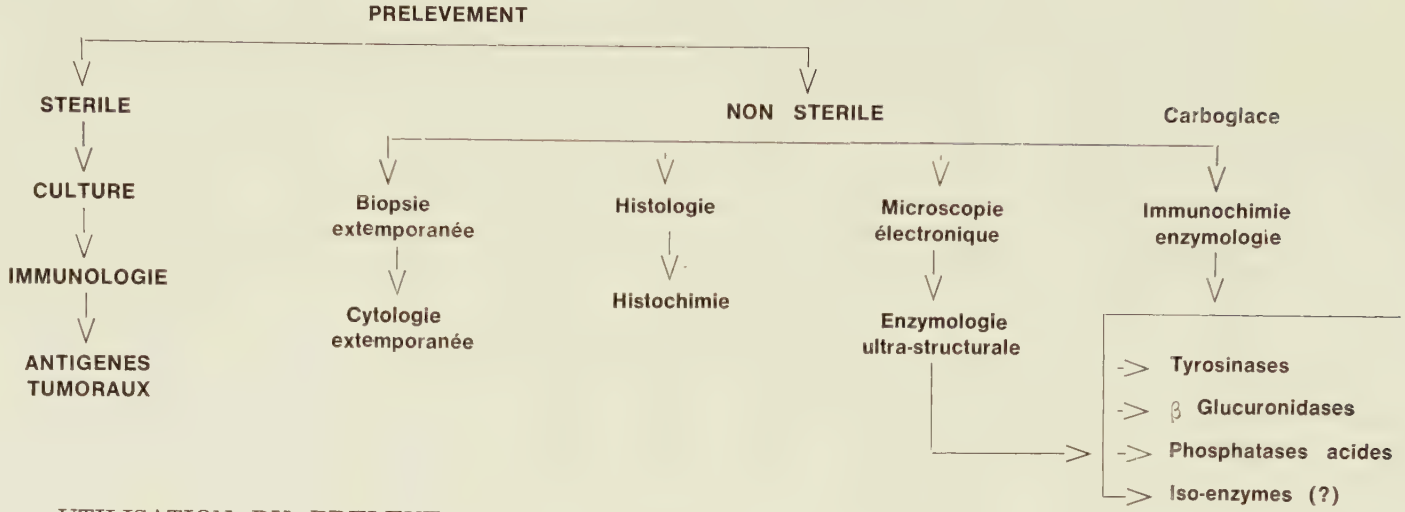
Il leur suffit, au moment de l'exérèse, de demander au groupe de biologistes de leur établissement, d'être à leur côté pour que tous les prélèvements nécessaires soient faits dans des conditions parfaites et rigoureuses.

La tumeur et le sang du malade qui seront prélevés, sont destinés à de longues et délicates recherches qui, en fin de compte, seront bénéfiques pour le malade. Ces prélèvements serviront au diagnostic, à l'étude des réactions immunitaires et ils permettront d'orienter la thérapeutique.

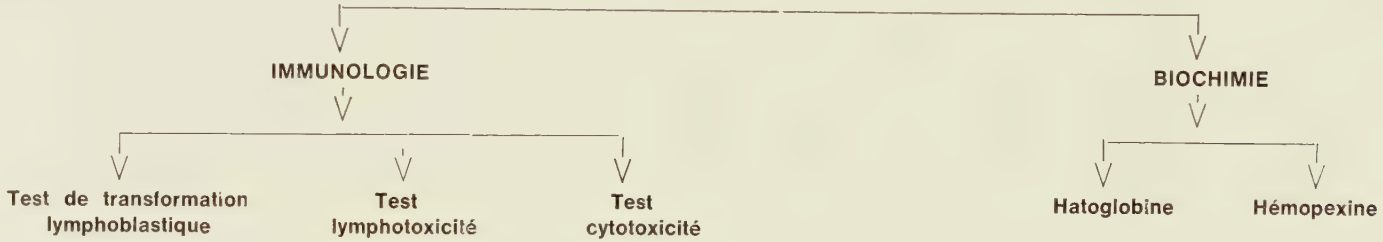
TABLEAU XII

PROTOCOLE D'ETUDE BIOLOGIQUE D'UN MELANOME HUMAIN AU MOMENT DE SON EXERESE

I. — UTILISATION DE LA TUMEUR



II. — UTILISATION DU PRELEVEMENT DE SANG



Conclusions

Au cours de ces trois dernières années, dans le Service de Recherche du Centre Régional Anti-Cancéreux de Marseille, nous avons participé, dans le groupe Mélanome, avec J.-P. CESARINI, sous la direction de H. BONNEAU, à l'étude anatomo-pathologique et ultrastructurale des tumeurs du système pigmentaire.

L'objectif choisi était de contrôler la nature exacte de certaines tumeurs mélaniques animales pour connaître leur valeur comme modèle expérimental et leur apport possible à la biologie des mélanomes humains.

Très rapidement, il s'est avéré que la seule morphologie, même ultrastructurale, ne pouvait atteindre le but fixé et nous avons dû avoir recours aux autres sections du groupe Mélanome dirigées par G. MEYER et J.-P. KLEISBAUER.

Le matériel expérimental comporte 379 hamsters, dont 213 ont présenté des tumeurs transplantables et 27 des tumeurs chimio-induites par le 9-10 diméthyl-1-2 benzanthracène (D.M.B.A.), et 11 chevaux atteints de tumeurs « noires » spontanées.

Les techniques histologiques, ultrastructurales, cytologiques, génétiques, biochimiques, isotopiques et immunologiques utilisées pour cette étude ont été détaillées pour faciliter la compréhension des résultats et leur étude critique.

I. — *LA NATURE EXACTE DES TUMEURS ANIMALES* ayant fait l'objet de notre étude expérimentale peut s'envisager ainsi à l'heure actuelle :

1) *La tumeur transplantable du hamster,* envoyée par G. MOORE du Rosewell Park Memorial Institute de Buffalo, qui l'avait lui-même reçue de FORTNER, a les caractères suivants :

— elle est constituée histologiquement de mélanocytes indifférenciés, anaplasiques qui ont perdu leur pouvoir mélanogène et leur activité tyrosinasique ;

— elle a conservé au cours des douze années de transplantation les antigènes tumoraux, cytoplasmiques et de membrane, spécifiques des tumeurs mélaniques, ainsi que son capital génétique avec certains chromosomes « marqueurs » ;

— elle fixe l'Iodoquine I^{125} comme toutes les tumeurs malignes du système mélanogène ;

— elle possède les caractères cytologiques, morphologiques et culturaux de la malignité et elle a un très haut pouvoir tumorigène en transplantation, en donnant de nombreuses métastases.

Cette tumeur mérite donc bien l'appellation de : Mélanome malin achromique, transplantable, FORTNER-MOORE souche 87.341 (R.P.M.I.), spontanée à l'origine.

2) *Les tumeurs chimio-induites par le D.M.B.A. chez le hamster* sont des formations dermiques d'origine mélanocytaire qui comportent un contingent encore plus élevé de mélanophages.

Elles s'apparentent, quant à leur structure, aux naevi cellulaires mélaniques bénins du type « naevus bleu ».

Il s'agit d'une tumeur bénigne à prise de greffe extrêmement difficile.

Nous proposons de lui réserver la dénomination de « Mélanome bénin du hamster chimio-induit par le D.M.B.A. ».

3) *Les tumeurs « noires » du cheval* sont des néoformations mélanocytaires hyperpigmentées, accompagnées d'une réaction histiocytaire mélanophagique qui masque les cellules tumorales.

Elles se présentent sous deux types, stades évolutifs d'un même processus à évolution lente.

Une mélanose localisée, nodulaire ou en nappe parfaitement supportée par l'animal, constituée histologiquement presque uniquement de mélanophages.

Un mélanome malin, avec des métastases ganglionnaires et viscérales multiples, où l'on retrouve les mélanocytes malins au milieu des mélanophages dans les localisations secondaires. Ce type tumoral succède en général au précédent.

Nous pensons qu'il faut désigner ces tumeurs suivant leur forme sous le vocable de « *Mélanose* et de *Mélanome malin* du cheval ».

II. — *LA VALEUR EXPERIMENTALE* de nos trois tumeurs animales se présente sous des aspects différents :

— *Le mélanome FORTNER-MOORE du hamster* peut servir aux essais thérapeutiques à visée immunologique, car c'est une tumeur bien testée et facilement transplantable. Cependant, son type histologique répond assez peu à la majorité des tumeurs mélaniques humaines. Par contre, son utilisation reste valable pour des travaux de génétique d'hybridation somatique, et surtout pour des essais de différenciation cellulaire.

— *Le mélanome chimio-induit par le D.M.B.A. du hamster* est une tumeur bénigne et ne répond pas aux exigences des essais thérapeutiques pour les mélanomes malins. Par contre, elle est très utile pour la mise au point des techniques de culture des tumeurs hyperchromiques. Elle est le point de départ pour des essais de transformation maligne d'une tumeur bénigne par des cocarcinogènes physiques, hormonaux ou viraux. La cellule bénigne qui la constitue peut servir de témoin dans les études des structures de surface des cellules malignes.

— Les tumeurs mélaniques du cheval avec leurs deux types sont à mi-chemin entre les deux tumeurs précédentes. Elles sont un modèle parfait pour l'étude biochimique, le mélanocyte équin étant semblable à celui de l'homme. Elles apportent un matériel biologique important pour la mise au point de toutes les techniques concernant les tumeurs mélaniques.

III. — *LES APPORTS A CE JOUR A LA BIOLOGIE GENERALE DES MELANOMES* et, en particulier, à ceux de l'homme, des tumeurs animales étudiées, peuvent s'envisager ainsi :

— Au point de vue morphologique, il faut faire ressortir l'importance de la distinction entre mélanocytes et mélanophages. Cette différence se base sur des critères histo-enzymologiques et ultrastructuraux, ce qui évitera pour les réactions immunologiques des erreurs d'interprétation.

— La tumeur FORTNER-MOORE a montré la constance au fil des années et des transplantations, des antigènes tumoraux spécifiques des tumeurs mélaniques et de la « balance » génétique. Elle a permis également de mettre au point toutes les techniques de lympho et de cytotoxicité qui vont servir à tester valablement chez l'homme les réactions de défense.

— Les études biochimiques, en particulier enzymatiques, ont permis de retrouver, dans les cellules mélanocytaires anaplasiques indifférenciées, l'empreinte des différents métabolismes caractérisant la cellule différenciée.

— Les faits expérimentaux font ressortir dans les mélanomes malins la multiplicité des facteurs inducteurs : agents physiques et chimiques, hormonaux et à peu près certainement viraux. Cette variété étiologique possible n'est pas sans évoquer l'aspect protéiforme des mélanomes malins chez l'homme.

C'est ainsi que l'hyperplasie mélanocytaire qui précède le mélanome malin sur mélanose de DUBREUILH pourrait correspondre à une transformation par les radiations ultra-violettes et se rattacherait à la carcinogénèse physique.

A l'opposé, le mélanome superficiel envahissant, atteignant les sujets jeunes, à évolution rapide sans radio-sensibilité, a des réactions immunologiques croisées qui font penser à une origine virale, ce qui est à prouver du reste.

Cela nous amène à constater que, si notre travail apporte quelques éléments nouveaux dans la biologie des mélanomes malins humains et animaux, il n'en reste pas moins un long chemin à parcourir !

Il est un argument en faveur de la recherche groupée en carcinologie et il montre la nécessité dans les mélanomes d'utiliser toutes les données biologiques possibles qui permettront une connaissance plus précise du diagnostic, des relations hôte-tumeur et des possibilités thérapeutiques.

Lu et approuvé,
le Président de Thèse :

Pr X. SERAFINO

Vu et approuvé,
le Doyen :

Pr H. ROUX

Bibliographie

1 LATARJET R., CHAMAILLARD D.-L. : Action inhibitrice d'extraits leucémiques isologues irradiés sur la leucémogénèse spontanée de la souris Akr. *Annales Insitut Pasteur,* **106,** 1964, p. 1 à 26.

2 BONNEAU H., COCHET G., FAVRE R. et MEYER G. : Essai d'un traitement immunitaire par extraits tumoraux irradiés aux rayons ultraviolets des tumeurs de hamster à virus polyome. *Bull. Cancer,* tome **57,** N° 1, janvier-mars 1970, p. 55.

3 LHERISSON-STRABONI A.-M. : Contribution à l'étude des antigènes tumoraux induits par le virus polyome. *Thèse Médecine Marseille,* 21-2-1969.

4 FAVRE R. : Contribution à l'étude expérimentale de l'immunothérapie antitumorale active spécifique. *Thèse Marseille,* 1972 (à paraître).

5 BONNEAU H.-P. : Pathologie d'une tumeur salivaire transplantable viroinduite chez la souris Akr. Apport à l'étude des tumeurs myo-épithéliales. *Mémoire pour le Certificat d'Etudes Spéciales d'Anatomie Pathologique,* Marseille 1971.

6 PEYRONNEL J.-C. : Contribution à l'étude du traitement auxiliaire de certains cancers par extraits tumoraux autologues irradiés aux rayons ultra-violets. *Thèse Médecine Marseille,* 1969.

7 BONNEAU H., PEYRONNEL J.-C., FAVRE R. et ROBERT-VAGUE D. : Essais de traitement auxiliaire de certains cancers humains par injections d'extraits tumoraux autologues irradiés aux rayons ultraviolets. *Bull. Canc.,* tome **57,** 1, 1970, p. 69.

8 CESARINI J.-P. : Contribution à l'étude ultrastructurale des tumeurs noires de la peau. *Thèse Médecine Marseille,* 1968.

9 BONNEAU H., ROBERT-VAGUE D., BONNEAU H.-P., CESARINI J.-P. : Les données cytobiologiques actuelles des mélanomes malins. Exposé à la Semaine de Cytologie hormonale et cancéreuse de Paris. *Rev. Cytol. Clin.* **IV**, N° 3, 1971 (à paraître).

10 MASSON P. : Les naevi pigmentaires, tumeurs nerveuses. *Ann. Anat. Paris,* **3**, 1926, pp. 417, 453, 657, 696.

11 MASSON P. : Pigment cells in man, in Miner, R.X. and GORDON. The biology of melanoma. *N.Y. Acad. Scienc.,* **4**, 1948, pp. 15-37.

12 MASSON P. : My conception of cellular naevi. *Cancer,* **4**, 1951, pp. 9-38.

13 MASSON P. : Tumeurs humaines. *Librairie Maloine S.A*, Dernière Edition Paris, 968.

14 BIRBECK M.S.C., MERCER E.H., BARNICOT N.A. : The structure and formation of pigment granules in human hair. *Exp. Cell. Research.*, **10**, 1956, pp. 505-514.

15 BIRBECK M.S.C., BARNICOT N.A. : Electron microscopic studies on pigment formation in human hair follicles. In. Pigment cell. Biology ed. by GORDON M. *New York Acad., Press. inc.*, 959, pp. 549-562.

16 BIRBECK M.S.C., BREATHNACH A.S., EVERALL J.D. : An electron microscopic study of basal melanocytes and High-Level clear cells in vitiligo. *J. Invest. Derm.* **37**, 1961, pp. 51-64.

17 BIRBECK M.S.C. : Electron microscopy of melanocytes. *Brit. Med. Bull.* **18**, 1962, pp. 220-222.

18 BIRBECK M.S.C. : Electron microscopy : the fine structure of hair bulb premelanosome. *Ann. N.Y. Acad. Scienc.* **100**, 1963, part. I, p. 540.

19 SEIJI M., SHIMAO K. : The site biosynthesis of mammalian tyrosinase. *J. Invest. Derm.* **37**, 1961, pp. 359-368.

20 SEIJI M., FITZPATRICK T.B., BIRBECK M.S.C. : The melanosome : a distinctive subcellular particule of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis. *J. Invest. Derm.* **36**, 1961, pp. 243-253.

21 SEIJI M., FITZPATRICK T.B. : The reciprocal relationschip betwen melanization and tyrosinase activity in melanosomes (melanin granules). *J. Biochem.* **49**, 1961, pp. 700-706.

22 SE'JI M., SHIMAO K., BIRBECK M.S.C., FITZPATRICK T.B. : Subcellular localization of melanin biosynthesis. *Ann. N.Y. Acad. Scienc.* **100**, 1963, pp. 497-533.

23 SEIJI M., FITZPATRICK T.B., SIMPSON R.T., BIRBECK M.S.C. : Chemical composition and terminology of specialized organelles (melanosomes and melanin granules) in mammalian melanocytes. *Nature* **197**, 1963, pp. 1.082-1.084.

24 SEIJI M. : Relation between melanin biosynthesis and membrane system in melanocyte. *Protein Nucléic. Acid. Enzyma.* **10**, 1965, pp. 83-89.

25 SEIJI M. : Subcellular tyrosinase activity and site of melanogenesis in melanocyte. In structure and control of the melanocyte. *Ed. by DELLA PORTA and O. MUHLBOK, Spinger Verlag. Berlin, Heidelberg, New-York,* 1966, pp. 123-133.

26 MISHIMA Y. : Melanosis circonscripta precancerosa (DUBREUILH). A nevoïd premelanoma disinct from jonction nevus. *J. Invest. Derm.* **34**, 1960, pp. 361-375.

27 MISHIMA Y. : New techn. for comprehensive demonstration of melanin premelanin and tyrosinase sites. *J. Invest. Derm.* **34**, 1960, pp. 355-360.

28 MISHIMA Y. : Electron microscopy of melanin synthesis in intra dermal nevus cells. *J. Invest. Derm.* **39**, 1962, pp. 369-372.

29 MISHIMA Y., MILLER-MIHOSKA A. : Junctionnal revealed and high-level dentritic cell with osmium. Iodide reaction in human and animal epidermis under condition of hyper-pigmentation and depigmentation. *J. Invest. Derm.* **37**, 1961, p. 107.

30 MISHIMA Y., LOUD A.V., SCHAUB F.F. Jr. : Electron microscopy of premelanin. *J. Invest. Derm.* **39**, 1962, pp. 55-62.

31 MISHIMA Y., LOUD A.V. : The ultrastructure of an melanized pigment cells in induced melanogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Scienc.* **100**, 1963, p. 607-617.

32 MISHIMA Y. : Electron microscopic cytochemistry of melanosomes and mitochondrias. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 1964, pp. 784-791.

33 MISHIMA Y. : Macroolecular changes in pigmentary disorders. *Arch. Derm.* **91**, 1965, pp. 519-557 - *Arch. Derm.* **92**, 1965, p. 393.

34 MISHIMA Y. : Macromolecular characterizations in neoplastic and dysfonctionnal human melanocytes, 1966, pp. 133-1577. In structure and control of the melanocyte. *Ed. by G. DELLA-PORTA and O. MUHLBOCK. Spinger Verlag. Berlin-Heidelberg. New-York.*

35 MISHIMA Y., COOPER M. : Subcellulard tyrosinase activity in amclanotic and Melanotic Fortner melanoma. *J. Cell. Biol.* **31**, 1966, p. 153 A.

36 MISHIMA Y., LOUD A.V., SCHAUB F.F. Jr. : Electron microscopy of keratin hipped human epidermis. *J. Cell. Biol.* **30**, 1966, pp. 417-423.

37 MISHIMA Y. : Melanocytic and Nevrocytic malignant melanosomas. Cellular differenciation. *Cancer,* **20**, 1967, pp. 632-649.

38 MISHIMA Y. : Macromolecular differenciation of nevocytic and melanocytic, malignant melanoma. *XIII° International Congress. of Dermatology Munich* (Germany), 31 juillet - 5 août 1967 (à paraître).

39 MISHIMA Y., WIDLAN S. : Enzymically active and inactive melanocyte population and ultraviolet, irradiation : combined DOPA-Premelanine reaction and electron microscopy. *J. Invest. Derm.* **49**, 1967, pp. 273-281.

40 CALAS E., BONNEAU H., CESARINI J.-P. : Quelques réflexions à propos de l'ultrastructure du mélanocyte et des tumeurs noires de la peau. *Bull. Soc. Franj. Derm.-Syph.,* **73**, 1966, pp. 688-692.

41 BONNEAU H., CESARINI J.-P. : Contribuiton des épithélioma baso-cellulaires pigmentés de la peau à l'étude de la mélanogénèse en microscopie électronique. *Bull. Soc. Franç. Derm.-Syph.,* **74**, 1967, p. 587.

42 CESARINI J.P., BONNEAU H., CALAS Ed. : Le halo-naevus de SUTTON. Etude structurale. *Ann. Der. et Syph. Paris,* **95**, 1968, 5-6, pp. 510 à 512.

43 CESARINI J.-P. : Mélanomes malins : acquisitions récentes ultrastructurales. *Rev. Inst. Past. Lyon,* **3**, 1970, pp. 281 à 293.

44 CESARINI J.-P. : Recent advance in the ultrastructure of malignant melanoma. *Europ. J. of Cl. and Biol. Research,* **XVI**, 1971, 4, pp. 316

45 BONNEAU H., CESARINI J.-P. : Un état pré-cancéreux particulier des muqueuses :a mélanose de DUBREUILH ; aspect histologique et ultrastructural. *Réunion des Médecins du Centre Anti-Cancéreux Rouen,* février 1970. (A paraître *Bull. Cancer,* 1971.)

46 CESARINI J.-P., BONNEAU H., BONNEAU H.-P. : La mélanose de DUBREUILH en carcinologie cervico-faciale : état pré-cancéreux ou cancer « in situ ». *Congrès de Carcinolcgie cervico-faciale Lyon,* 10-11 novebre 1970. (A paraître *J. Fr. O.R.L.,* 1971.)

47 CLARK W.H., FROM L., BERNARDINO E.A., MIHM M.C. : The histogenesis and biologic behavior of primary human alignant melanomas of the skin. *Cancer Research,* **29**, 1969, 3, pp. 705-727.

48 HARDING H.E., PASSEY R.O. : A transplantable melanom in the mouse. *J. Path. and Bact.,* **33**, 1930, pp. 417-427.

49 ALGIRE G.H., LEGALLOIS F.Y. : Growth and vascularization of transplanted mouse melanoma. In biol. of melanomas. *N.Y. Ac. Sc.* (Special publ.), **4**, 1948, pp. 159-170.

50 SUGINRA K. : The effect of various physical and chemical factors on transplantable mouse melanoma. In biol. of melanomas. *N.Y. Acac. Scienc.* (Special Publ.), **4**, 1948, pp. 369-387.

51 CLOUDMAN A.M. : Spontaneous neoplasms in mice. In G.D. SNELL (ed) Biology of Laboratory Mouse by the Staff of the ROSCOE. B. JACKSON Memorial Laboratory. Chap. 4. Philadelphie, Blakiston et C°, 1941.

52 ALGIRE G.H. : Growth and pathology of melanoma S 91 in mice of strains D.B.A., A and C. *J. Nat. Cancer Inst.,* **5**, 1944, pp. 151-160.

53 LOUSTALOT P., ALGIRE G.H., LEGALLOIS F.Y., ANDERSON B.F. : Growth and histo-pathology of melanotic and amelanotic derivatives of the CLOUDMAN melanoma S 91. *J. Nat. Cancer. Inst.,* **12**, 1952, pp 1.079-1.1.117.

54 WOODS M.W., DU BUY H.G., BURK D., HESSELBACH M.L. : Cytolcgical studies on the nature of the cytoplasmic particulates in the CLOUDMAN S 91 mouse melanoma. The direved ALGIRE S 91 A partially amelanotic melanoma and the HARDING-PASSEY mouse melanoma. *J. Nat. Cancer Inst.,* **9**, 1949, pp. 311-323.

55 IGLESIAS R. : Spontaneous transplantable melanoma of the rat. *Proc. Amer. Ass. Cancer Research,* **3**, 1960, p. 122.

56 IGLESIAS R., SALINAS S. : Transplantable melanotic tumors induced in A X C rats by a single feeding of D.M.D.A. *Proc. Amer. Ass. Cancer Research,* **6**, 1965, p. 32.

57 DELLA-PORTA G.H., RAPPAPORT U., SAFFIOTTI K., SPENCER, SHUBIK : Induction of melanotic lesion during skin carcinogenesis in hamster. *A.M.A. Arch. Path.,* **61**, 1956, pp. 305-313.

58 ILLMAN O., GHADIALLY F.N. : Coat colour and experimental melanotic tumour production in the hamster. *Britfl J. Cancer,* **14**, 1960, pp. 483-488.

59 QUEVEDO W.C., CAIRNS J., BOCKS F., BURNS R. : Induction of melanotic tumours in the withe (« partiel Albino ») syrian hamster. *Nature,* **189**, 1961, pp. 936-938.

60 RAPPAPORT H., PIETRA G., SHUBIK P. : The induction of melanotic tumors ressemblig cellular blue naevi in the hamster by cutaneous application of 7.12 dimethyl-benzanthracène. *Cancer Res.,* **21**, 1961, pp. 661-666.

61 SHUBIK P., PIETRA G., DELLA-PORTA G. : Studies of skin carcinogenesis in the syrian golden hamster. *Cancer Res.*, **20**, 1960, pp. 100-105.

62 KIKRMAN H., ALGARD T., ROBBINS M., ALGARD A. : Androgene-œstrogene induced melanotic tumor associated with flanc organ hair follicles in syrian hamster. *Anat. Rec.*, **124**, 1956, pp. 318-319.

63 PIETRA G., SHUBIK P. : Induction of melanotic tumour in the syrian golden hamster administration of ethyl-carbonate. *J. Nat. Cancer Inst.*, **25**, 1960, pp. 627-630.

64 TOTH B., TOMATIS L., SHUBIK P. : Multipotentiel carcinogenesis with uretnan in the syrian golden hamster. *Cancer Res.*, **21**, 1961, pp. 1.537-1.541.

65 FORTNER J.G. : Spontaneous tumours including gastro-intestinal neoplasms and malignant melanomas, in the syrian goldel hamster. *Cancer*, **10**, 1957, pp. 1.153-1.156.

66 FORTNER and ALLEN A.C. : Hitherto unreported malignant melanoma in the syrian hamster : an experimental counterpart of the human malignant melanoma. *Cancer Res.*, **18**, 1958, pp. 98 à 107.

67 GREEN E. H.S.N. : A spontaneous melanoma in the amster with a propensity for a melanotic alteration and sarcomatous transformation during transplantation. *Cancer Res.*, **18**, 1958, pp. 422-425.

68 BOMIRSKI A., DOMINICZAK T., NOWINSKA L. : Spontaneous transplantable melanoma in the golden hamster. *Acta. Virio. Int. Centra Cancrum*, **18**, 1962, pp. 178-180.

69 OBERMAN B., RIVIERE M.R. : Experimental melanoma in hamster. In structure and control of the melanocyte. *Ed. by DELLA-PORTA and MUHLBOCK.* Spinger Verlag Editors. 1966, pp. 268-273.

70 COSTACHEL O., POPP I., DUMITRESCU S., MIRONESCU St., NACHTIGAL M. : Heterotransplantation of experimental melanoma. In structure and control of the melanocyte. *Ed. by DELLA-PORTA and* MUHLBOCK. Spinger Verlag editors 1966, pp. 28-285.

71 GOLDBERG S.A. : The differential features between melanosis and melanosarcoma. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **56**, 1919-1920, pp. 140-153 and 250-264.

72 FELDMAN W.H. : Neoplasm of domesticated animals. *Philadelphie W.B. SAUNDERS*, 1932.

73 HADWEN S. : The melanomata of grey and white orses. *J. Canad. Med. Ass.*, **25**, 1931, pp. 519-530.

74 Mc FEDYEAN J. : Equine melanomatosis. *J. Comp. Path.*, **46**, 1933, pp. 186-204.

75 RUNNELS R.A., BENBROOK E.A. : Malignant melanomas of horses and mules. *Ann. J. Vet. Res.*, **2**, 1941, pp. 340-344.

76 LEVENE A.L. : The comparative pathology of melanoma. In the comparative physiology and pathology of the skin. *Oxford Blackwell*, 1965, pp. 759-775.

77 LEVENE A. : Comparative aspect of the melanoma of grey and white horses, a unique proliferative disorder of pigment production. In structure and control of the melanocyte. *Ed. by DELLA-PORTA and MUHLBOCK.* Spinger Velarg, 1966.

78 BONNEAU H., DURAND M.-G., BONNEAU H.-P., KLEISBAUER J.-P. : Les apports du mélanome du cheval à la biologie générale de ces tumeurs. Présentation au 2e Colloque international sur la Biologie du Mélanome malin. Lyon, 10 juin 1971. A paraître *Bull. Inst. Past. Lyon,* 1971.

79 SIXTH INTERNATIONAL PIGMENT CELL CONFERENCE SPONSORED by the international union aganist Cancer. *Ed. by DELLA-PORTA G. and MUHLBOCK.* Spinger Verlag, Berlin - Heldelberg, New-York, 1966.

80 1er COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LA BIOLOGIE DU MELANOME MALIN : Lyon 12 juin 1970. Rapports dans *Rev. Inst. Past. Lyon,* **3**, 1970, 3, pp. 171-318.

81 2me COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LA BIOLOGIE DU MELANOME MALIN : Lyon, 10 juin 1971. Rapports à paraître *Rev. Inst. Past. Lyon,* 1971.

82 LEVER W.F. : Histopathology of the skin. 2 nd ed. Philadelphie, London et Montreal. *J.B. Lippincott Co.,* 1954.

83 DESTAVILLE H. : « Mélanomes malins de la civté buccale ». *Thèse de Doctorat en Chirurgie Dentaire,* Marseille, 1971.

84 BREATHNACH A.S. : The cell of Langherans. *Int. Rev. Cytol.,* **18**, 1965.

85 PRUNIERAS M. : Intercation between keratinocytes and dendritic cells. *J. of Inv. Dermat.,* **52**, 1969, N° 1, pp. 1-17.

86 WOLFF K., SCHREINER E. : Uptake intracellular transport and degradation of exogenous protein by Langherans cells. *J. of Inv. Dermat.,* **54**, 1970, N° 1, pp. 34-37.

87 LUND H.Z., KRAUSS J.M. : Melanotic tumors of the skin. *Atlas of tumor pathology, Armed Forces Institute of Pathology Fascicle,* Washinghon, **3**, 1962, pp. 1-134.

88 Mac GOVERN V.J., M.D., MALCOLM M. LANE BROWN : The nature of melanoma. *Ch. C. Thomas Publischer Springfield,* Illinois (U.S.A.), 1969.

89 BONNEAU H., LHERISSON A.-M., MEYER G., CESARINI J.-P., COSTE G. : Isolement d'une tumeur transplantable induite par le virus Polyome chez le hamster doré. *C.R. Soc. Biol.,* **161**, 1967, N° 2, p. 378.

90 RIVAS D., HEIKEL P. : Sobre un notable case de melano sarcomatosis generalisada en un équino. *Gaç. Veterinaria.* T. **XVII**, 1955, p. 8.

91 LOMBARD Ch. et Coll. : Relation de 5 mélanoblastomes : deux chez le bœuf, trois chez le chien. *Bull. Ac. Vét.,* **37**, 1964, p. 181.

92 DRIEUX H., PRAT J. : Contribution à la casuistique de la mélanose dans l'espèce bovine. *Rev. Méd. Vétérinaire,* **CXLIV**, 1968, p. 771.

93 BONNEAU H. : Technique de la biopsie extemporanée. *Presse Médicale,* **69**, 1961, N° 27, p. 1.223-1.226.

94 BONNEAU H. : Evolution des indications de la biopsie extemporanée. *Presse Médicale,* **69**, 1961, N° 28, p. 1.285-1.286.

95 MASSON P. : Tumeurs humaines : histologie, diagnostic et techniques. *Librairie Maloine,* Paris, 960.

96 GABES M. : Techniques histologiques. *Masson et Cie,* Paris, 1968.

97 LISON L. : Histochimie et cytochimie animale. *Gauthier Villard,* Paris, 1960 (2 volumes).

98 PEARSE E. Ag. : *Histochemistry Theorical and applied. Churchill,* London, 1960.

99 CULLING C.F.A. : *Histochemistry technic. Butterworths,* London, 1963.

100 GANTER P., JOLLES G. : Histochimie normale et patologique (2 volumes). *Gauthier Villard,* Paris, 1970.

101 LEJEUNE F. J. : Etude des macrophages dans le mélanome Harding-Passey. 2me réunion sur la biologie du mélanome, Lyon, juin 1971 (à paraître : *Rev. Inst. Past. Lyon,* 1971).

102 MISHIMA Y. : *Acta. Derm. Venerol.,* **46**, 1966, pp. 307-309.

103 BOYLAND E. : The biochemistry of cancer of the bladder. *British Med. Bull.,* **14**, 1958, p. 153.

104 FISHMAN W. H., ANLYAN A. J. : β glucuronidase activity in human tissues. Some correlations with processis of malignant growth and with the physiology of production. *Canc. Res.,* **7**, 1947, p. 808.

105 FISHIMA Y. : Melanotic tumors. P. 388 in « zelickson A. S. » ultrastructure of normal sub-normal skin. Philadelphia 1967. *Lea and Febiger ed.*

106 KIRCHEIM D., GYARKEY Y, BRANDS D., SCOTT N. W. : Histochemistry of normal hyperplastic and neoplastic human prostate gland. *Invest.* Urol., **1**, 1964, p. 403.

107 OKA R., OKAMOTO Y., OMACHI K., MORI M. A. : Histochemical observations of β glucuronidase in neoplasms. *Orag. Surg.* **17**, 1964, p. 628.

108 ALLEN N. : β glucuronidase activity in tumors of the nervous system. *Neurology,* **11**, 1961, p. 578.

109 MONIS B., BANKS B.M., RUTENBURG A.M. : β glucuronidase activity in maligant neoplasms of man. *A Histochemical Study. Cancer,* **13**, 1960, p. 386.

110 WAGNER R. L., ROTH J. S. : Some propertics of β glucuronidase activity in normal rat liver and in several transplantable rat hepatomas. *Cancer Res.,* **27**, 1967, p. 2.053.

111 NOVIKOFF A.B., ALBALA A., BEIMPICA L. : Ultrastructural and cytochemical observations on B 16 and Harding-Passey mouse melanoma. The origine of premelanosomes and compound melanosomes. *J. Histo. Chem. Cyto. Chem.,* **16**, 1968, p. 299.

112 HEWITT J., GUIGON M., BOLUBASZ J., MASSON C. : Activité de la β glucuronidase dans les tumeurs pigmentaires de la peau humaine. Etude histochimique et biochimique. *European J. of Clinical and Biol. Res.,* **15**, 1970, N° 4, p. 416-423.

113 GLAUERT A.M., GLAUERT R.H. : *J. Biophys. Biochemis. Cytologie,* **4,** 1958, p. 191.

114 CESARINI J.-P., DUHAL J.-P. : Micro-méthode utilisant des lamelles de matière plastique pour l'étude ultrastructurale des cultures de tissus. Technique et valeur de la méthode. *J. Franç. Micro-Elect.,* **6,** 1967, N° 4, p. 50 a.

115 REYNOLDS E.S. : The use of lead-citrate at hight pH as an embedding electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.,* **17,** 1963, p. 208-211.

116 DEFENDI V., GASIC C. : *J. Cellular Comp. Physiol.,* **62,** 1963, p. 23-31.

117 CESARINI J.-P., BONNEAU H. : Mise en évidence en microscopie électronique des glucoprotéines de surface des cellules transformées par le virus Polyome et de Rous. IV[e] Congrès Européen de Microscopie Electronique. *Electron Microscopy,* 1968, **II,** p. 577.

118 CESARINI J.-P., BONNEAU H. : Mise en évidence par la technique de Rambourg des glycoprotéines de surface d'une souche transformée par le virus Polyome : les aspects de différenciation cellulaire. *C. R. Soc. Biol,* **162,** 1968, 12, p. 2.168.

119 LUFT J.H. : **6** *th Int. Congr. in electron microscopy,* Kyoto, **2,** 1966, p. 65-66.

120 MARTINEZ-PALOMO A., BRAILOWSKY : *Virology,* **34,** 1968, p. 379-382.

121 BONNEAU H., LHERISSON A.M., MEYER G., CESARINI J.-P., COSTE G. : Isolement d'une tumeur transplantable induite par le virus Polyome chez le hamster doré. *C. R. Soc. Biol.,* **161,** 1967, N° 2, p. 378.

122 BONNEAU H., CESARINI J.-P., LHERISSON A.M., BEREBBI M., VARETTE I. : Isolement d'une tumeur transplantable induite par le virus Polyome chez le hamster doré et entretenu par transplantation. *C. R. Soc. Biol.,* **161,** 1967, N° 2, p. 378.

123 TOSHIMA I., MOORE G.E. : *J. Nat. Cancer Institut,* **21,** 1968, p. 202.

124 OETTGEN and Coll. : *J. Nat. Cancer Inst.,* **41,** 1968, p. 827-843.

125 BEREBBI M. : Etude du sexe caryotypique d'une tumeur transplantable dans le système polyome-hamster. *Bull. Ass. Franç. Cancer,* **54,** 1967, 4, p. 409-418.

126 KLEISBAUER J.-P., POIRIER R., MEYER G. : Etudes des tyrosinases extraites du mélanome spontané du hamster. *C. R. Soc. Biol.*

127 KLEISBAUER J.-P., MEYER G., POIRIER R. : Etude immuno-chimique des protéines solubles extraites d'un mélanome achromique de hamster. *C. R. Soc. Biol.*

128 POMERANTZ S.H. : *J. Biol. Chem.,* **238,** 1963, p. 2.351.

129 BURNETT J.-B., SEILER et BROWN I.V. : *Cancer. Res.,* **27,** 1967, p. 880.

130 BURNETT et SEILER : *J. Invest. Dermat.,* **52,** 1969, p. 199.

131 CHIAN T.Y., WILGRAM G.F. : *Science,* **155,** 1967, p. 198.

132 BONNEAU H., ROBERT-VAGUE D., BONNEAU H.P. : Aspect histologique du mélanome expérimental du hamster. *Rev. Inst. Past.,* Lyon, 3, 1970, 3, p. 295-302.

133 SAFI N. : Utilisation des indicateurs nucléaires pour la détection des tumeurs endo-oculaires. *Thèse Doctorat en Médecine,* N° 24, Bordeaux, 1969.

134 BLANQUET P., LE RERELLEUR M.J., SAFI N., VERIN Ph. : Emploi de la Diiodofluorescéine marquée à l'I. 131 en ophtalmologie. *Symposium Fluorescéine,* 1969, Karger Basel, 1971.

135 VERIN Ph., BLANQUET P., MORETTI J.-L., SAFI N. : Utilisation d'un nouveau vecteur radioactif dans la détection des tumeurs mélaniques intra-oculaires. *Communication Soc. Opht. Franç.,* Lyon, 1969.

136 BLANQUET P., MORETTI J.-L., SAFI N., VERIN Ph. : Utilisation d'un nouveau vecteur dans le diagnostic des mélanomes.

137 BLANQUET P., LE COURANT P., TEXIER L., TAMISIER J.M., MORETTI J.-L., SAFI N. : Utilisation de l'Iodoquine dans les mélanomes de la peau. *Bull. Soc. Franç. Derm. Syphil.,* **77**, 1970, p. 16.

138 REBOUL J., BLANQUET P., BELLET M., AZALOUX H., MORETTI J.-L., VILAYLECK S., SAFI N. : Un nouveau traceur radio-actif pour les mélanomes malins : applications thérapeutiques. *Bordeaux Méd.,* **12**, 1970, p. 2.881-2.884.

139 SAFI N. : La recherche des maladies résiduelles par les molécules mar- 2me Réunion Internationale sur la Biologie du Mélanome, Lyon, 10 juin 1971.

140 MORETTI J.-L., SAFI N., VILAYLECK S., BLANQUET P. : 131 I. Iodoquine for diagnosis and localization of malignant melanoma. *J. of Nuclear Med.* (à paraître 1971).

141 OUTCHERLONY O. : Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy,* **1**, 1958, p.-9.

142 BASKAEV J.S., ROSENBAUM G.J. : Isutchemic perevivacmoi melanomi Harding-Passey v. reactif precipitatii. *Vopz Oncol.,* **2**, 1963, p. 83-87.

143 KLEIN G., CLIFFORD P., KLEIN E., STJERNNAERD J. : Search for tumor specific immune reaction in Burkitt's lymphoma patients by the membrane immunofluorescence reaction. *J. Proc. Nat. Acad. Sciences,* U.S., **55**, 1966, p. 1.628-1.635.

144 BOEVA M. : Immunogical studies of the transplantable hamster melanome in structure and control of the melanocyte. *Sixth International Pigment Cells Conference,* ed. by Della-Porta and Muhlbock, Springer Verlag, 1966.

145 NAIRN R.C. : Fluorescent proteïn tracing. 3 rd. Ed. Lewingstone, Edinburgh.

146 NGU W.A. : Host defense to Burkitt Tumor. *But. Med. J.,* **I**, 1967, p. 345-347.

147 MORTON D. L., MALMGREN R. A., HOLMES E. C., KETCHAM A. S. : Demonstration of antibodies against human malignant melanoma by immunofluorescence. *Surgery,* **64**, 1968, p. 233-240.

148 OLD D.L., BOYSE E.A. : Prospect for immunotherapy of human cancer. *Ann. Int. Med.,* **69**, 1968, p. 393.

149 SOUTHAM C. M. : Evaluation of immunologic capability of cancer patients. *Cancer Res.*, **28**, p. 1.455.

150 MATHE G. : Immunotherapy of malignant disease. *Brit. Med. J.*, **4**, 1969, p. 7.

151 MUNA N.M., MARCUS S., SMART C. : Detection by immunofluorescence of antibodies specific for human malignant cells. *Cancer*, **23**, 1969, p. 88-93.

152 HAMILTON-FAIRLY G. : Immunity in malignant disease in man. *Brit. Med. J.*, **2**, 1969, p. 467.

153 LEWIS M.G., IKONOPISOV R.I., NAIR R.C., PHILIPS T.M., HAMILTON-FAIRLY G., BODENHAM D.C., ALEXANDER P. : Tumour specific antibodies in human malignant melanoma and their relation ship to the extent of the disease. *Brit. Med. J.*, **3**, 1969, p. 547-552.

154 RUMKE P. : Imminologtsche aspecten van fret Malnoom. *Ned. T. Geneesk*, **113**, 1969, 2, p. 76-77.

155 LEWIS M.G. : Interactions between melanocytes and tumours cells. *In Press*, 1970.

156 LEWIS M.G. : Immunology of malignant melanoma. *Rev. Inst. Past. Lyon*, **3**, 1970, 3, p. 177-201.

157 MEYER G. : Discussion sur la communication de M.G. Lewis. *Rev. Inst. Past. Lyon*, **3**, 1970, 3, p. 203-205.

158 NAGEL G.A. : Immunité cellulaire du mélanome. *Rev. Inst. Past. Lyon*, **3**, 1970, 3, p. 207-217.

159 THIERS H., FAYOLLE H., GENTILHOMME O., DIVRY P. : Réactions ganglionnaires cytologiques d'incitation antigénique chez le cobaye injecté avec un broyat de mélanome malin. *Rev. Inst. Past. Lyon*, **3**, 1970, p. 219-225.

160 CARRAZ-BOURGOIN J.-J., VEYSSIERE C., GEHARD J.-P., SASSARD M. : Action lymphocytotoxique de sérums antilymphocytes humains et animaux sur les lymphocytes de malades porteurs de mélanomes malins. *Rev. Inst. Past. Lyon*, **3**, 1970, 3, p. 237-244.

161 LHERISSON-STRABONI A.M., MEYER, BONNEAU H. : Détection d'un antigène de membrane dans le système tumoral polyome-hamster. *Bull. Cancer*, **54**, 1967, 4, p. 419-422.

162 HELLSTROM I. : *Irt. J. Cancer*, **2**, 1967, p. 65.

163 DATTA S.K., VANDEPUTTE M. : Studies on cellular and humoral immunity to tumor — specific antigens in Polyoma — virus induced. *Cancer Research*, **31**, 1971, p. 882-889.

164 NAGEL G.A., ST-ARNEAULT G., HOLLAND J.F., KIRKPATRICK R. : *Cancer Research*, **30**, 1970, p. 1.828.

165 AUBERT Ch., BOHUON et COMOY E. : Excrétion urinaire de la 3.4 déhydorxyphenylalanine (DOPA) et la dopamine chez les hamsters porteurs de mélanomes induits ou greffés. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **268**, 1969, p. 2.850-2.852.

166 AUBERT Ch., BOHUON C. : Dépigmentation produite chez le hamster doré par l'administration d'une dose per os de 9.10 diméthyl 1.2 benzanthracène. Rôle de l'épiphysectomie par Truhaut. *C. R. Acad. Sci. Paris,* **271**, 1970, p. 281-284.

167 AUBERT Ch., PRADE M., BOHUON C. : Effet de la pinéalectomie sur les tumeurs mélaniques du hamster doré, induites par l'administration (per os) d'une seule dose de 9.10 diméhyl 1.2 benzanthracène. *Acad. Sci. Paris,* **271**, 1970, p. 2.465-2.468.

168 GHADIALLY E.N., BARKER J.F. : The hiostogenisis of experimental induced melanotic tumours in the Syrian Hamster (Cricetus auratus). *J. Pat. Bac,* **79**, 1960, p. 265-272.

169 CHERNOZEMSKI I. : Melanotic tumors in the Syrian golden Hamster after cutaneous application of DMBA. *Oncologia* (Sofia), **1**, 1964, N° 2, p. 1-12.

170 RAICHEV R., CHERNOZEMSKI I. : Tumor in Syrian Hamster after skin application of 9.10 dimethyl 1.2 benzanthracene (DMBA). *Oncologia* (Sofia), **1**, 1964, p. 5-12.

171 CHERNOZEMSKI I. : Changes in skin of the Syrian Hamster after a single application of 9.10 dimethyl 1.2 benzanthracene. *Sixth Int. Pigment Cells Conference,* ed. by Della-Porta and Muhlbock, Springer Verlag, 1966.

172 RIVIERE M.R., OBERMAN B., ARNOLD J., GUERIN M. : Tumeurs mélaniques et mélanomes induits chez le hamster doré par application cutanée de carbonate d'éthyl (Uréthane). *Bull. Cancer,* **52**, 1965, N° 2, p. 127-144.

173 BURROWS M.T. : The growth of human malignant tumors in vitro. *Med. Record.,* **86**, 1914, p. 649.

174 TAKANO Y. : Cultures of human melanosarcoma. *Path. Soc.* (Societas Pathologica Japonica trans), 1929, p. 264-266.

175 SANO M.E., SMITH L.W. : Tissue culture as a diagnostic aid the identification of atypical tumors. *Arch. Path. Vol.,* **30**, 1940, p. 504-508.

176 TIMOFEYEVSKI K. : Tumor origine as determined by tissue culture. *Ann. Rev. Soviet. Med.,* **4**, 1946, p. 106-110.

177 GRAND C.G., CAMERON G. : Tissue culture studies of pigmented melanoma : fish, mouse, an human. The biology of melanoma. *N. Y. Acad. Sci.,* 1948, p. 171-176.

178 RAVEN R.W. : Problemas concerning melanoma in man. Pigment cell growth. *N. Y. Acad. Press,* 1953, p. 121-137.

179 FJELDE A. : Human tumor cells in tissue culture. *Cancer,* **8**, 1956, p. 845-851.

180 HU F., STARICCO R.J., PINKUS H., FOSNAUGH R.P. : Human melanocytes in tissue culture.*J. Invest. Derm.,* **28**, 1957, p. 15-32.

181 HU F. : Cytological studies of human pigment in tissue culture. Pigment cell. Biology. *N. Y. Acad. Press,* 1957, p. 142-156.

182 MOORE G.E., LEHNER D.F., KIKUCHI Y., LESS L.A. : Continuous culture of a melanotic cell fine from the golden hamster. *Science,* **137**, **1962**, p. 986-987.

183 ROSE G.G. : Observation on human melanoma cells in tissue culture. *An. N. Y. Acad. Sci.,* **100**, 1963, p. 92-144.

184 HU F. : Ultrastructural changes in the cell cycle of cultured melanoma cells. *Anatomical Record,* **170**, 1971, p. 41-55.

185 CESARINI J.-P. : Etat actuel de la culture des mélanomes malins humains. *Mémoire pour l'étude approfondie de biologie humaine,* Marseille, 1971 (non publié).

186 HUSTED L., HOPKINS J.T., MOORE M.B. : The X-bivalent of the golden hamster. *J. Heredity,* **36**, 1945, p. 93-96.

187 MATTHEY R. : Les chromosomes des muridae. *Rev. Suisse Zool.,* **60**, 1953, p. 225-283.

— OHNO S., WEILER C. : Sex chromosome behavior pattern in germ and somatic cells of mesocricetus auratus. *Chromosoma,* **12**, 1961, p. 362-373.

188 FORD D.K., YERGANIAN G. : Observations on the chromosomes of cinese hamster cells in tissue culture. *J. Nat. Cancer Inst.,* **21**, 1958, p. 393-425.

189 FORD D.K., YERGANIAN G. : Further observations on the chromosomes of the chinese hamster cells in tissue culture. *J. Nat. Cancer Inst.,* **22**, 1959, p. 765-799.

190 ISHIHARA T., MOORE G.E., SANDBERG A.A. : Chromosomes constitution of cells in effusions of cancer. *J. Nat. Cancer Inst.,* **27**, 1961, p. 893-933.

191 MOORE G.E., LEHNER D.F., KIKUCHI Y., LESS L.A. : Continuous culture of a melanotic cell line from the golden hamster. *Science,* **137**, 1962, p. 986.

192 ISHIHARA T., MOORE G.E., SANDBERG A.A. : Etude caryotypique de deux tumeurs spontanées du hamster doré. *J. of the Nat. Cancer Inst.,* **29**, 1962, 1, p. 161.

193 ISHIHARA T., MOORE G.E., SANDBERG A.A. : The « in vitro » chromosome constitution of cells from human tumor. *Cancer Res.,* **22**, 1962, p. 375-379.

194 OBERMAN B. et al. : Electron microscopic studies of melanotic and amelanotic melanoma in hamster. *Lijecr Vjesr,* **91**, 1969, p. 947-953.

195 KLUG H. et al. : Light and electron microscopic studies of malignant melanomas in man and in the golden hamster. *Derm. Mschr.,* **155**, 1969, p. 81-88.

196 TALAWAY P., FISHMAN W.H., HUGGINS C. : Chromogenic substrates : II Phenolphtalen glucuronic acid as a substrate for the anay of glucuronidase activity. *J. Biol. Chem.,* **166**, 1946, p. 755.

197 KLEIN G. : Tumor Antigens. *Ann. Rev. Microbiol.*, **20**, 1966, p. 223 à 252.

198 BOEVA M. : Immunological studies on the transplantable hamster melanoma. Structure and control of the melanocyte by Della-Porta and Muhlbock, Springer Verlag, 1966, p. 210-211. Discussion p. 211 à 28.

99 MEYER G. : Viral genome and oncogenic transformation nuclear and plasma events. *In advence in Cancer Research,* **14**, 1971, p. 71-159.

200 MEYER G., LHERISSON-STRABONI A.M., BONNEAU H. : Evolution en immunofluorescence de l'antigène tumoral induit par le virus polyome dans la souche BHK 21. *Bull. Assoc. Franç. Cancer,* **54**, 1967, p. 79-86.

201 HELLSTROM I., HELLSTROM K.E., PIERLE G.E., BILL A.H. : Cellular and humoral immunity to different type of human neoplasme. *Nature,* **220**, 1968, p. 1.352-1.354.

202 FOSSATI G., COLNAGHI M.I. : Metodiche per lo studio della riposta immunologica cellulare contro cellule tumorali umane coltivate in vitro. *Tumori,* **56**, 1970, N° 5, p. 291-296.

203 FOSSATI G., COLNACHI M.I., DELLA PORTA G., CASCINELLI N., VERONESI U. : Cellular and humoral immunity against humour malignant melanoma. *Int. J. Cancer,* **8**, 1971, p. 344-350.

204 LEVENE A. : Equine melanotic disease. *Tumori,* **57**, 1971, p. 133-168.

205 RIVIERE M.R., OBERMAN B., CHOUROULINKOV I., GUERIN M. : Etude anatomo-pathologique et comportement biologique d'un mélanome (M. 622) greffable et métastasant du hamster doré. *Bull. Ass. Franç. Cancer,* **49**, 1962, p. 44-72.

206 RIVIERE M.R., PERRIER N.I., CHOULOULINKOV I., GUERIN M. : Tumeurs mammaires développées chez le hamster femelle après application cutanée ou injection d'uréthrane. *C. R. Soc. Biol.*, **158**, 1964, p. 440-444.

207 MONTAGNIER L., Mac PHERSON I.A. : *C. R. Acad. Sciences Ser D,* **258**, 1964, p. 4.171-4.173.

208 MONTAGNIER L., MEYER G., VIGIER P. : *C. R. Acad. Sciences Ser D,* **168**, 1969, p. 2.976-2.989.

209 MONTAGNIER L. : *Int. Symp. Tumor Viruses,* 2 nd, 1970, p. 19-32.

210 FIRTH INTER. CONF. on Cell differentiation. Nice 13-16 sept. 1971 (à paraître).

211 M.C. et SONNECK J.M. : Hémopexine. Variations au cours de mélanomes malins.

212 SPITALIER J.-M., AMALRIC R. : Les mélanomes malins cutanés. 1969, Ed. A. RICHARD, Toulon - MAUPETIT, Marseille.

BIBLIOGRAPHIE ALPHABETIQUE

A

ALBALA A. : 111.
ALEXANDER P. : 153.
ALGARD A. : 62.
ALGARD T. : 62.
ALGIRE G.-H. : 49, 52, 53.
ALLEN A.-C. : 66.
ALLEN N. : 108.
AMALRIC A. : 213.
ANDERSON P.F. : 53.
ANLYAN A.-J. : 104.
ARNOLD J. : 172.
AUBERT J. : 165, 166, 167.
AZALOUX H. : 138.

B

BANKS B.-M. : 109.
BARKER J.-F. : 168.
BARMICOT N.-A. : 14-15.
BASKAEV J.-S. : 142.
BEIMPICA L. : 111.
BELLET M. : 138.
BENBROOK E.-A. : 75.
BEREBBI M. : 122-125.
BERNARDINO E.-A. : 47.
BILL A.-H. : 201.
BIRBECK M.-S.-C. : 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23.
BLANQUET P. : 134, 135, 136, 137, 138, 140.
BOCKS F. : 59.
BODENHAM D.-C. : 153.
BOEVA M. : 144, 198.
BOHUON C. : 165, 166, 167.
BOLUBAST J. : 112.
BONNEAU H. : 2, 7, 9, 40, 41, 42, 45, 46, 78, 89, 93, 94, 117, 118, 121, 122, 132, 161, 200.
BONNEAU H.-P. : 5, 9, 46, 78, 132.
BOMIASKI A. : 68.
BOYLAND E.-E. : 103.
BOURGOIN J.-J. : 160, 212.
BOYSE E.-A. : 148.
BRAILOWSKI : 120.
BRANDS D. : 106.
BREATHNACH A.-S. : 16, 84.
BROWN I.-V. : 129.
BURNETT J.-B. : 129, 130.
BURNS R. : 59.
BURK D. : 54.
BURROWS M.-J. : 173.

C

CAIRNS J. : 59.
CALAS Ed. : 40, 42.
CAMERON G. : 177.
CARRAZ M. : 160.
CASSINELI N. : 203.
CESARINI J.-P. : 8, 9, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 89, 114, 117, 118, 121, 122, 185.
CHAMAILLARD L. : 1.
CHERNOZMENSKY I. : 169, 170, 171.
CHIAN T.-Y. : 131.
CHOUROULINKOV I. : 205, 206.
CLARK W.-H. : 47.
CLIFFORD P. : 143.
CLOUDMAN A.-M. : 51.
COCHET G. : 2.
COLNAGHI M.-I. : 202, 203.
COMOY E. : 165.
COOPER M. : 35.
COSTE G. : 89, 121.
COSTACHEL O. : 70.
CULLING C.-F.-A. : 99.

D

DARGENT M. : 212.
DATTA S.-K. : 163.
DELLA PORTA G.-H. : 57, 60, 61, 203.
DEFENDI V. : 116.
DEFONTAINES M.-C. : 212.
DESTAVILLE H. : 83.
DIVRY P. : 159.
DOMINICZAK T. : 68.
DRIEUX H. : 92.
DU BUY H.-G. : 54.
DUHAL J.-P. : 114.
DUMITRESCU S. : 70.
DURAND M.-G. : 78.

E

EVERALL J.-D. : 16.

F

FAURE R. : 2, 4, 7.
FAYOLLE H. : 159.
FELDMAN W.-H. : 72.
FISHMAN W.-H. : 104, 196.
FITZPATRICK T.-B. : 20, 21, 22, 23.
FJELDE A. : 179.
FORTNER J.-G. : 65, 66.
FORD D.-K. : 188.
FOSNAUGH R.-P. : 180.
FOSSATI G. : 202, 203.
FROM L. : 47.

G

GABES M. : 96.
GANTER P. : 100.
GASSIC G. : 116.
GEHARD J.-P. : 160.
GENTILHOMME O. : 159.
GHADIALLY F.-N. : 58, 168.
GLAUERT A.-M. : 113.
GLAUERT R.-H. : 113.
GOLDBERG S.-A. : 71.
GRAND C.-G. : 177.
GREENE H.-S.-N. : 67.
GUERIN M. : 172, 205, 206.
GUIGON M. : 112.
GYARKEY Y. : 106.

H

HADWEN S. : 73.
HAMILTON-FAIRLEY G. : 152, 153.
HARDING H.-E. : 48.
HEIKEL P. : 90.
HELLSTROM I. : 162, 201.
HESSELBACH M.-L. : 54.
HEWITT J. : 112.
HOLLAND J.-P. : 164.
HOLMES E.-C. : 147.
HOPKINS J.-T. : 186.
HU F. : 180, 181, 184.
HUGGINS C. : 196.
HUSTED L. : 186.

I

IGLESIAS R. : 55, 56.
IKONOPISOV R.-L. : 153.
ILLMAN O. : 58.
ISHIHARA I. : 190, 192, 193.

J

JOLLES G. : 100.

K

KETCHAM A.-S. : 147.
KIRCHEIM D. : 103.
KIKUCHI Y. : 182, 191.
KIRKMAN H. : 62.
KIRKPATRICK D. : 164.
KIRKPATRICK R. : 164.
KLEIN E. : 143.
KLEIN G. : 143, 197.
KLEISBAUER J.-P. : 78, 125, 127.
KLUG H. : 195.
KRAUSS J.-M. : 87.

L

LANE BROWN : 88.
LATARJET R. : 1.
LE COURANT P. : 137.
LEGALLOIS F.-Y. : 49, 53.
LEJEUNE F.-J. : 101.
LEHNER D.-F. : 182, 191.
LHERISSON-STRABONI A.-M. : 3, 89, 121, 122, 161, 200.
LE RERELLEUR M.-J. : 134.
LESS C.-A. : 182, 191.
LEVENE A.-L. : 76, 77, 204.
LEVER W.-F. : 82.
LEWIS M.-G. : 153, 155, 156.
LISON L. : 97.
LOMBARD Ch. : 91.
LOUD A.-V. : 30, 31, 36.
LOUSTALOT P. : 53.
LUFT J.-H. : 119.
LUND H.-L. : 87.

M

Mac FEDYEAN J. : 74.
Mac GOVERN V.-J., M.-D. : 88.
Mac PHERSON I.-A. : 207.
MALCOLM M. : 88.
MALGREN R.-A. : 147.
MANUEL M. : 212.
MARCUS S. : 151.
MARTINEZ-PALOMO A. : 120.
MASSON C. : 112.
MASSON P. : 10, 11, 12, 13, 95.
MATHÉ G. : 150.
MATTHEY R. : 187.
MERCER E.-H. : 14.
MILLER-MIHOSKA A. : 29.
MIRONESCU S.-T. : 70.
MISHIMA Y. : 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 102, 105.
MONIS B. : 109.
MONTAGNIER L. : 207, 208, 209. 192, 193.
MOORE G.-E. : 123, 182, 190, 191,
MOORE M.-B. : 186.
MORETTI J.-L. : 135, 136, 137, 138, 140.
MORI M.-A. : 107.
MORTON D.-L. : 147.
MUNA N.-M. : 151.

N

NACHTIGAL M. : 70.
NAGEL G.-A. : 158, 164.
NAIRN R.-C. : 145, 153.
NGU W.-A. : 146.
NOVIKOFF A.-B. : 111.
NOWINSKA L. : 68.

O

OBERMAN B. : 69, 172, 194, 205.
OETTGEN : 124.
OHNO : 187.
OKA R. : 107.
OKAMOTO : 107.
OLD D.-L. : 148.
OMACHI K. : 107.
OUTCHERLONY O. : 141.

P

PASSEY R.O. : 48.
PEARSE E.-A.-G. : 98.
PERRIER N.-I. : 206.
PEYRONNEL J.-C. : 6, 7.
PHILIPS T.-M. : 153.
PIERLE G.-E. : 201.
PIETRA G. : 60, 61, 63.
PINKUS H. : 180.
POIRIER R. : 126, 127.
POMERANTZ S.-H. : 128.
POPP I. : 70.
PRADE M. : 167.
PRAT J. : 92.
PRUNIERAS M. : 85.

Q

QUEVEDO W.-C. : 59.

R

RAICHEU R. : 170.
RAPPAPORT H. : 57, 60.
RAVEN R.-W. : 178.
REBOUL J. : 138.
REYNOLDS E.-S. : 115.
RIVAS D. : 90.
RIVIERE M.-R. : 68, 172, 205, 206.
ROBBINS M. : 62.
ROBERT-VAGUE D. : 7, 9, 132, 211.
ROSE G.-G. : 183.
ROSENBAU G.-J. : 142.
ROTH J.-S. : 110.
RUMKE P. : 154.
RUNNELS R.-A. : 75.
RUTENBURG A.-M. : 109.

S

SAFFIOTI K. : 57.
SAFI N. : 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140.
SAINT-ARNEAULT G. : 164.
SALINAS S. : 56.
SANDBERG A.-A. : 190, 192, 193.
SANO M.-E. : 175.
SASSARD M. : 100.
SCHAUB F.-F. Jr : 30, 36.
SCHREINER E. : 86.
SCOTT N.-W. : 106.
SEIDJI M. : 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25.
SEILER : 129, 130.
SHIMAO K. : 19, 22.
SHUBIK P. : 57, 60, 61, 63, 64.

SIMPSON R.-T. : 23.
SMART C. : 151.
SMITH L.-W. : 175.
SONNECK J.-M. : 212.
SOUTHAM C.-M. : 149.
SPENCER : 57.
SPITALIER J.-M. : 213.
STARICCO R.-J. : 180.
STJERNAERD J. : 143.
SUGINRA K. : 50.

T

TAKANO Y. : 174.
TALAWAY P. : 196.
TAMISIER J.-M. : 137.
TEXIER L. : 137.
THIERS : 159.
TIMOFEYUSKI K. : 176.
TOMATIS I. : 123.
TOSHIMA I. : 123.
TOTH B. : 64.

V

VANDEPUTTE M. : 163.
VARETTE I. : 122.
VERIN Ph. : 134, 135, 136.
VERONESI U. : 203.
VEYSSEYRE C. : 160.
VIGIER P. : 208.
VILAYLECK S. : 138, 140.

W

WAGNER R.-L. : 110.
WEILER C. : 187.
WIDLAN S. : 39.
WILGRAM G.-F. : 131.
WOLFF K. : 86.
WOODS M.-W. : 54.

Y

YERGANIAN G. : 189.

Table des Matières

INTRODUCTION 23

PREMIERE PARTIE

Chapitre I. — Historique 25

Chapitre II. — Les données actuelles sur la pathologie et la biologie des tumeurs du système mélanogène 29

DEUXIEME PARTIE : Matériel et moyens d'étude 53

Chapitre I. — Les animaux 55

Chapitre II. — Origine des tumeurs 59

I. — Mélanome spontané du hamster
II. — Mélanome chimio-induit D.M.B.A. du hamster
III. — Les tumeurs « noires » du cheval

Chapitre III. — Les techniques utilisées 81

I. — Anatomie Pathologique
II. — Ultra-structure
II. — Culture de tissus
IV. — Génétique
V. — Biochimie
VI. — Isotopes
VII. — Immunologie

TROISIEME PARTIE : Etude analytique des données morphologiques et biologiques 113

Chapitre I. — Les données morphologiques 115

I. — Mélanome spontané du hamster FORTNER-MOORE
II. — Mélanome chimio-induit par le D.M.B.A. chez le hamster
III. — Les tumeurs mélaniques du cheval

Chapitre II. — Les données biologiques 151

I. — Les données de la culture des mélanomes
II. — Les données de la génétique
III. — Les données de la biochimie
IV. — Les données des isotopes
V. — Les données immunologiques

QUATRIEME PARTIE : Etude synthétique 179

Chapitre I. — Cadre nosologique des tumeurs animales étudiées .. 180

I. — Mélanome spontané FORTNER-MOORE
II. — Mélanome chimio-induit par le D.M.B.A. chez le hamster
III. — Tumeurs « noires » du cheval

Chapitre II. — Valeur expérimentale des trois tumeurs mélaniques étudiées 191

I. — Mélanome FORTNER-MOORE
II. — Mélanome chimio-induit D.M.B.A.
III. — Mélanose et mélanome malin du cheval

Chapitre III. — Les apports à la biologie des mélanomes humains des tumeurs animales 197

I. — Les apports de la morphologie
II. — Les apports de l'immunologie et de la génétique
III. — Les apports de la biochimie
IV. — Contribution à l'étiopathogénie des mélanomes

CONCLUSIONS 205

BIBLIOGRAPHIE 209

Serment d'Hippocrate

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate,

Je promets et je jure, au nom de l'Etre Suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine,

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrait pas que des considérations de religion, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine, dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes Confrères si j'y manque.